Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. Bock

Titrimetrische Untersuchungen am Blutplasma

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Hansjörg Bettex
aus Hannover

1964

8007

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Prof.Dr.med. H. B o c k

TITRIMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN AM BLUTPLASMA

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Doktorgrades
der M e d i z i n
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard - Karls - Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Hansjörg Bettex
aus Hannover

Dekan:	Professor Dr.med. H. Harms
1.Berichterstatter:	Dozent Dr.med. H.P. Missmahl
2.Berichterstatter:	Professor Dr.med. H. Bock

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Inhaltsverzeichnis:

I. Problemstellung der Arbeit unter Hinweis auf vorangegangene Arbeiten über "Titrimetrische Untersuchungen am Urin" und über den "Säure-Basen-Haushalt des Blutes und dessen Erfaßbarkeit".

II. Titrimetrische Untersuchungen in der Chemie und Biochemie.
   a) Titrationskurven starker und schwacher Säuren.
   b) Die Eiweißkörper als puffernde Ampholyte und die Abhängigkeit ihrer Titrationskurven.
   c) Über titrimetrische Untersuchungen an Eiweißen des Blutplasmas des Menschen.

III. Über die im Blut und besonders im Blutplasma wirkenden Puffersysteme, ihr Mengenverhältnis und ihre Bedeutung.

IV. Eigene Untersuchungen am Blutplasma des Menschen.
   a) Über die Technik der Versuchsausführung. Voruntersuchungen über die Beeinflußbarkeit der Titrationskurve des Humanalbumins und die Reproduzierbarkeit von Kurven des Plasmas.
   b) Variationsbreite und Differenz von Kurven des Plasmas gesunder und kranker Personen.
   c) Auswertung der Titrationskurven.
   d) Kritische Wertung der Ergebnisse.

V. Zusammenfassung.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547602_0046

Problemstellung der eigenen Arbeit unter Hinweis auf vorangegangene Arbeiten über "Titrimetrische Untersuchungen am Urin" und den "Säure-Basen-Haushalt des Blutes und dessen Erfaßbarkeit".

Im Anschluß an die Arbeit von K. KONRAD (Dissertation 1962) (9) über die Titrationsacidität des Urins, lag es nahe, ähnliche Untersuchungen am Blutplasma durchzuführen. KONRAD hat mit einem automatischen Titriergerät bei Personen mit verschiedenen Erkrankungen Titrationskurven des Urins geschrieben. Diese Kurven ergaben, daß außer dem Ausgangs-pH des Urins, die Titrationsacidität, die molare Konzentration des NH_4-Ions und die molare Konzentration der noch verbleibenden Puffersubstanzen im Urin abgelesen werden konnten. Daraus ergab sich die Möglichkeit, aus der Titrationskurve Niereninsuffizienzen auf einfachem Wege zu erkennen, da z.B. bei Patienten mit einer Niereninsuffiziens der Ammoniumgehalt des Urins im Verhältnis zum Ausgangs-pH erniedrigt ist.

Vergleicht man die Konzentrationsverhältnisse der im Urin und der im Plasma vorhandenen Stoffe und berücksichtigt man vor allem deren Pufferfähigkeit, so wird klar, wie sowohl Problematik als auch Ergebnisse bei einer Titrimetrischen Untersuchung des Urins und einer solchen des Blutplasmas unterschiedlich ausfallen müssen. Die folgende Tabelle I der prozentualen Zusammensetzung von Urin und Blutplasma und deren Konzentrationsverhältnisse zeigt deutlich die große Unterschiedlichkeit in der Menge der puffernden Substanzen.

Tabelle I

Stoff	Blutplasma	Harn	Verhältnis
Eiweiß	7 - 8 %	0	0
Fett, Kolloide	-	-	-
Wasser	90 - 93 %	95 g %	-
Glukose	0,1 mg %	0	0
Natriumionen	0,32 %	0,35 mg %	1 : 1
Chlorionen	0,37 %	0,6 "	1 : 2
Harnstoff	0,03 %	2,0 "	1 : 67
Harnsäure	0,004 %	0,05 "	1 : 12
Kaliumionen	0,02 %	0,15 "	1 : 8
Amoniumionen	0,001 %	0,04 "	1 : 40 (200)
Calciumionen	0,008 %	0,15 "	1 : 2
Magnesiumionen	0,0025 %	0,006 "	1 : 2
Phosphate	0,009 %	0,15 "	1 : 17
Sulfate	0,002 %	0,18 "	1 : 90
Indikan	0,098 %	2,53 "	1 : 26
Kreatinkörper	0,001 %	0,1 "	1 : 500 - 700

Prozentuale Zusammensetzung von Blutplasma und Harn unter üblichen Absonderungsbedingungen und Konzentrationsverhältnissen beider. (FREY) (13).

Die Stoffe, die im Urin den größten Pufferеffekt, d.h. die stärkste Beeinflussung der Titrationskurve wie z,B. NH_4 und Phosphate bewirken, treten im Blutplasma in nur sehr niedriger Konzentration auf. Die Eiweiße hingegen, die bekanntlich stark puffernde Substanzen sind, erscheinen im Harn Gesunder nicht, im Blutplasma dagegen in hoher Konzentration. Es konnte also nicht erwartet werden, daß etwa eine Konzentrationsbestimmung des Ammoniums möglich würde.

Aus der Arbeit von CONRAD ist zudem ersichtlich, wie groß die Streuung der Konzentration der im Urin puffernden Substanzen ist.

Schon im normalen Urin läßt sich eine starke Schwankung der Zusammensetzung während eines Tages finden. Die Ernährung

allein bewirkt einen großen Teil dieser Änderungen. Im Blutplasma hingegen werden alle Konzentrationsverhältnisse, vor allem der puffernden Substanzen, unter normalen Bedingungen weitgehend konstant erhalten. Es wird also durch die geringe Variationsweite auch die Variationsmöglichkeit der Titrationskurve eingeschränkt sein.

Was war nun von der Titration des Plasmas zu erwarten?

1.) Von WATZEL (35) wurde eine Methode zur Erfassung von Lage und Stabilität des "Säure-Basen-Haushalts" im Blut dargestellt. Für die Erfassung der Pufferfähigkeit aller Puffersysteme galt die Senkung des pH-Wertes als Maß nach Zugabe einer bestimmten Menge HCl und Austreibung der Kohlensäure. Die Abweichung der pH-Senkung von der dem Bicarbonatgehalt entsprechenden Norm wurde als Puffereffekt angegeben.

2.) In der Literatur über die Methoden der titrimetrischen Bestimmungen des Bicarbonats im Plasma wird immer wieder darauf hingewiesen, daß die Inkonstanz der Abweichungen der ermittelten Werte durch die Unterschiedlichkeit der Eiweißpufferkapazität bedingt sei.(4), (10), (35). Bei der Beschreibung einer Methode zur Bestimmung der Alkalireserve wurde angegeben, daß für die Fälle mit gleichem Eiweißpuffervermögen sich eine Eichung durchführen ließe. Unter pathologischen Bedingungen seien jedoch die Abweichungen durch den Eiweißfaktor so groß, daß die Methode unzuverlässige Werte lieferte. 1/6 der fixen Säuren werden durch Bicarbonat abgepuffert, für 5/6 treten jedoch die Proteine ein.(35).

ad 1: Es galt nun zu untersuchen, welche Puffer sich neben dem Bicarbonat mit der Titrationskurve noch erfassen ließen, d.h. welche Faktoren den sog. Puffereffekt erhöhen oder erniedrigen.

ad 2: Da als Puffersystem neben dem Bicarbonat hauptsächlich das Eiweiß wirkt, mußte geprüft werden, ob allein dieses den Puffereffekt veränderte oder noch andere Faktoren dabei mitwirkten.

Wie aus GAMBLE (14) ersichtlich, erhöht sich bei einer Nephritis der Anionenrest im Plasma, dessen Pufferfähigkeit einzubeziehen ist, so daß noch weitere Faktoren über das Bicarbonatsystem hinaus die Pufferfähigkeit des Plasmas verändern.

Zu 1% wirken die Phosphatsalze am Puffereffekt des Plasmas mit (6). So war weiterhin eine Frage, wie weit eine Erhöhung des Phosphatspiegels bei Niereninsuffizienzen durch die Titration des Plasmas zu erfassen sei.

Daß die Proteine infolge der sauren und basischen Gruppen ihrer Aminosäuren in einem pH-Bereich zwischen 1 und 13 Wasserstoffionen binden oder abgeben können (24), zeigt die Titrationskurve des Plasmas deutlich. Eine Abweichung der puffernden Faktoren im Blutplasma von Normalwerten müßte demnach von der Titrationskurve abzulesen sein. - Kurz zusammengefaßt war von der Titration des Plasmas die Beantwortung folgender Fragen zu erwarten:

1.) Welche Faktoren bestimmen außer dem Bicarbonatsystem die Pufferkapazität des Blutplasmas?

2.) Sind durch die Titrationskurven weitere Puffersysteme qualitativ und quantitativ erfaßbar?

3.) Ist das Eiweiß in seiner Pufferfähigkeit beeinflußbar und gegebenenfalls wie stark?

Um die Kurven des Plasmas beurteilen zu können, war es notwendig, die Pufferfähigkeit des Eiweißes für sich allein zu untersuchen. Derartige Messungen sind schon seit langer Zeit häufig durchgeführt worden, denn es ist schon lange bekannt, daß die Dissoziation von Anionen und Kationen stark vom äußeren Milieu abhängig ist. Es soll deshalb jetzt ausführlich auf die Titration in der Chemie im allgemeinen und in der Biochemie im besonderen eingegangen werden.

. Titrimetrische Untersuchungen in der Chemie und Biochemie

.) Titrationskurven starker und schwacher Säuren.

Die Titration von Säuren und Basen spielt in der Chemie und Biochemie eine hervorragende Rolle. So läßt sich der Gehalt einer Lösung an Säure (oder Base) sehr leicht bestimmen, indem man zu einer gemessenen Menge derselben aus einem graduierten Glasrohr tropfenweise eine Basenlösung (oder Säurenlösung) bekannter Konzentration hinzugibt. Ein zugegebener Indikator zeigt den pH-Wert an, bei dem die Säure neutralisiert ist. Aus der Menge verbrauchter Base (Säure) läßt sich an Hand der Reaktionsgleichungen berechnen, wieviel Säure in der vorgegebenen Menge Lösung enthalten war. Wenn man nun die Menge der zugegebenen Säure (Base) als Funktion der Änderung des pH-Wertes einer Base (Säure) in ein Koordinatensystem einträgt, so erhält man die sog. Titrationskurve dieser Säure. Die Titrationskurve zeigt nun nicht nur wie der Indikator den Endpunkt der Titration an, sondern sie gibt auch darüber Auskunft, in welcher Art und Weise eine Säure neutralisiert wird. Bekanntlich sind stark dissoziierende Säuren nicht puffernd, d.h. ihre Neutralisationspunkte werden in der Titrationskurve durch einen pH-Sprung angezeigt. Bei Zugabe von 0.1 Aequival. Base springt der pH der Salzsäure von 3 auf 11. Im Kurvenbild stellt sich das Verhalten der Säure folgendermaßen dar: Die Säure hat einen Ausgangswert von etwa pH 1. Bei Zugabe von OH^--Ionen steigt die Kurve steil an und wendet sich bei Erreichen einer äquivalenten Menge Base ziemlich plötzlich von pH 3 bis zum pH 11 horizontal verlaufend nach rechts. Die Steigung der Kurve ist im pH-Bereich 3 - 11 gleich 0, erst dann nimmt die Steigung wieder zu (Abb.2). Anders ist es bei der Neutralisation schwacher und mittelstarker ein- oder mehrbasiger Säuren wie z.B. der dreibasigen Citronensäure (Abb.2). Der pH ändert sich trotz Zugabe von NaOH nur sehr langsam. In einem mehr oder minder zur pH-Achse geneigten Winkel steigt die Titrationskurve an, oder sie zeigt bei mehrwertigen Säuren einen treppenförmigen Verlauf (Abb.1).

In Abb. I ist die Kurve der Phosphorsäure dargestellt. Die Kurve steigt steil an, verliert bei Zugabe von NaOH allmählich an Steigung, bis bei Erreichung des Äquivalenzpunktes die Steigung gleich O ist. Mit Beginn der nächsten Dissoziationsstufe nimmt die Steigung wieder zu. Am Wendepunkt der Kurve, dort wo sie von einer Linkskurve in eine Rechtskurve übergeht, hat die Steigung ihren höchsten Wert erreicht. Bei weiterer Zugabe von Titriemittel fällt die Steigung wieder bis zum Wert O ab. Der zweite Äquivalenzpunkt ist erreicht. Die dritte Dissoziationsstufe zeigt dasselbe Bild. Je steiler demnach eine Titrationskurve verläuft, desto besser puffert die entsprechende Säure, d.h. sie stellt der Änderung des pH durch die zugegebene Lauge einen Widerstand entgegen. Man kann also aus der Titrationskurve die Dissoziationsstärke und Pufferfähigkeit einer Säure ablesen. Der pK-Wert einer Säure ist als der Wert definiert, bei dem diese ihr Pufferungoptimum angibt; er liegt in der Mitte zwischen Pufferbeginn und -ende. Dieser Punkt zeichnet sich dadurch aus, daß hier die H^+-Konzentration numerisch gleich der Dissoziations-Konstanten der Säure ist (21). Die Kurve hat an dieser Stelle einen Wendepunkt. Jede Säure hat ihren charakteristischen pK-Wert, der aus der Titrationskurve ablesbar ist. Eine schwache Säure hebt sich also von einer starken Säure in typischer Weise durch ihre Titrationskurve ab, weil sie in einem bestimmten Reaktionsbereich, der von der Größenordnung ihrer Dissoziationskonstanten abhängt, puffert. Tritriert man beispielsweise ein Gemisch von Essigsäure und Salzsäure mit NaOH und trägt auf der Abszisse die Konzentrationen zugesetzter NaOH, auf der Ordinate den pH-Wert ab, so erhält man eine Titrationskurve, die von der einer reinen HCl-Lösung abweicht, und man kann aus dem maximalen Abstand in der Richtung der Abszisse die Konzentration im Säuregemisch ablesen. Außerdem wird der pK-Wert der Essigsäure ablesbar (26). Abbildung 3 zeigt, daß mehrere Säuren als Gemsich durch die Titrationskurve sowohl quantitativ als auch qualitativ bestimmbar sind. Anders ausgedrückt, zeigt die Titrationskurve an, in welchem pH-Bereich sich der Übergang von der nichtionisierten in die ionisierte Form bei irgendeiner Säure oder

Base vollzieht. Natürlich ist der Analyse einer Lösung verschiedener Säuren oder Basen oder puffernder Salze dann ein Ende gesetzt, wenn mehrere Säuren oder Salze in der Lösung vorhanden sind, deren pK-Werte so nahe beieinander liegen, daß sich die Pufferungsbereiche stark überlagern. Als Regel kann man sagen, daß eine Titration mit einer Genauigkeit von 1% noch möglich ist, wenn das Verhältnis beider Dissoziationskonstanten ausgedrückt in molarer Konzentration von H^+ gleich oder größer als 10^4 ist, sofern beide Säuren etwa in der gleichen Konzentration in der Lösung vorhanden sind (KOLTHOFF) (21).

Das Beispiel zweier Titrationskurven von Citronensäure und Phosphorsäure (Abb.1) zeigt je einen Fall von nahe beieinander und weiter auseinanderliegenden pK-Werten. Beide Säuren sind dreibasisch, d.h. beide dissoziieren in drei Stufen. Liegen die einzelnen Dissoziationskonstanten, wie dies z.B. bei der Phosphorsäure der Fall ist, weit genug auseinander, so erfolgt die Dissoziation auf jeder Stufe unabhängig von der folgenden. Bei einem bestimmten pH sind immer nur zwei Formen gleichzeitig nebeneinander vorhanden, z.B. undissoziierte Phosphorsäure H_3PO_4 und primäres Anion $H_2PO_4^-$, oder primäres und secundäres Anion $H_2PO_4^{--}$. Wenn sich die Dissoziationskonstanten jedoch stark nähern wie bei der Citronensäure, so überschneiden sich die Bereiche der Dissoziation einzelnen Gruppen. Bei einem bestimmten pH-Wert können also nebeneinader nicht nur zwei, sondern mehrere Dissoziationsstufen vorhanden sein. Wir erhalten ein fast lineares Ansteigen der Titrationskurve. Bei der Titration der Eiweiße spielen diese Gesetze eine große Rolle.

Es ist also durch Auswertung der Titrationskurve ein Rückschluß auf die Zusammensetzung einer Lösung erlaubt. Ein Beispiel am enteiweißten Blutserum des Menschen soll zeigen, wie groß die Bedeutung der Titrationskurve auch in der Analyse einer unbekannten Lösung sein kann.

So konnten "MOND und NETTER" (26) die Frage über das Vorhandensein eines Defizits an Anionen im Blut mit Hilfe titrimetrischer Untersuchungen am Ultrafiltrat von Rinderserum klä-

ren. Es wurde ein Ultrafiltrat von Serum mit steigenden Mengen an Salzsäure titriert und die gewonnene Kurve mit der einer NaCl-Lösung, die die gleiche Menge an Natriumbicarbonat enthielt wie das Ultrafiltrat und der die gleichen HCl-Mengen zugesetzt wurden, verglichen.

Die Kurve des Ultrafiltrates verlief von pH 5 ab wesentlich flacher als die Kontrollkurve. Bei pH 2 näherten sich die Kurven wieder (Abb.4). Die maximale Abweichung betrug 0,8 ccm n/40 HCl, was einer Säurekonzentration von n/100 entsprach. Das Pufferungsoptimum lag in der Mitte zwischen pH 5 und pH 2. Die gesuchte Säure müßte demnach etwa eine Dissoziationskonstante von $10^{-3,5}$ haben. Damit war durch ein einfaches Verfahren erwiesen, daß sich im Ultrafiltrat des Rinderserums eine Säure, bzw. ein Säuregemisch von der Dissoziationskonstanten $10^{-3,5}$ und der Konzentration von n/100 befand. Es handelte sich, wie sich später erwies, um die Milchsäure.

b) Die Eiweißkörper als puffernde Ampholyte und die Abhängigkeit ihrer Titrationskurven.

Neben der Analyse verschiedener in einer Lösung befindlicher Säuren oder Basen dient die Titration zur Strukturaufklärung von Eiweißkörpern. Schon sehr früh zog die Tatsache, daß Eiweiße leicht mit großen Mengen an Base oder Säure in Verbindung gebracht werden konnten, ohne daß sich der pH-Wert wesentlich änderte, Aufmerksamkeit auf sich.

Die Stärke der Pufferwirkung des Eiweißes beruht auf der Anwesenheit dissoziierbarer Anionen und Kationen der Aminosäuren, aus denen die Eiweiße zusammengesetzt sind. Die Fähigkeit der Proteine, bei allen pH-Werten zwischen etwa pH 1 und pH 13 Wasserstoffionen zu binden oder abzugeben, beruht darauf, daß im Molekül saure und basische Gruppen verschiedener Stärke vorhanden sind. Jede einzelne Gruppe bindet Wasserstoffionen nur in einem beschränkten pH-Bereich, und zwar in der Umgebung ihres pK-Wertes. Der amphotere Charakter der Aminosäuren, d.h. ihre Fähigkeit sowohl H-Ionen abgeben als auch binden zu können, bleibt

bei deren Aufbau zu Eiweißkörpern zum Teil erhalten, obwohl sie in der Art der Peptidbindung so zum Eiweißmolekül verknüpft werden, daß eine große Zahl der dissoziierenden Gruppen verloren geht. Die überaus vielfältige Reaktionsmöglichkeit erhält das Eiweiß, aber nicht durch seine Peptidhauptkette, sondern durch die Seitenketten, bei denen die dissoziierenden Gruppen noch frei sind. Von ihnen leitet sich der amphotere Charakter der Proteine ab (36). Durch starke Säuren werden die COO^--Gruppen entladen und in COOH überführt. Durch Laugen werden NH_3-Gruppen entladen.

Da die Dissoziation der H^+ bzw. OH^- - Ionen stark von der Ionenaktivität der Umgebung abhängig ist, ist der pK-Wert, die sog. Dissoziationskonstante, im eigentlichen Sinne keine Konstante. Sie ändert sich mit der Konzentration der reagierenden Stoffe. Dies erklärt sich aus der elektrostatischen Wechselwirkung der Ionen, weshalb der Begriff des pK' eingeführt wurde. Die folgende Tabelle II gibt die charakteristischen Dissoziationskonstanten, ausgedrückt als pK-Werte einiger in den Proteinen des Plasmas vorkommender saurer und basischer Gruppen an.

Aus der Tabelle II geht deutlich hervor, daß die pK-Werte sehr nahe beieinander liegen. Die Pufferungsbereiche der einzelnen Gruppen werden sich demnach stark überlappen, so daß die pK-Werte nicht mehrere Wendepunkte der Titrationskurve bewirken. Es tritt bei der Titration solch eines Makroions nur ein durchgehender Zug der Kurve auf, wie es ähnlich in vereinfachter Form an der Citronensäure gezeigt wurde.

Carboxyl	3,0 - 3,2 pK bei 25 C
Carboxyl (Asparaginsäure)	3,0 - 4,7
Carboxyl (Glutaminsäure)	etwa 4,4
Phenolisches Hydroxyl (Tyrosin)	9,8 -10,4
Sulfhydril	9,1 -10,4
Imidazol (Histidin)	5,6 - 7,0
Ammonium (Lysin)	9,4 -10,6
Ammonium	7,6 - 8,4
Guanidino (Arginin)	11,6 -12,6

Tabelle II. Charakteristische Dissoziationskonstanten, als

pK-Werte ausgedrückt, einiger in Proteinen vorkommender saurer und basischer Gruppen (NETTER) (27).

Gruppe bzw. Aminosäure	Eieralbumin	Lactoglobulin	Albumin
Amino	15	27	58
Imidazol	4	4	16
Guanidin	14	7	24
Phenol	?	?	18
Asparaginsäure	28	30	-
Glutaminsäure	50	59	100
$-CO-NH_2$	32	30	-
freies Carboxyl	46	59	-
Phosphorsäure	1	-	-

Tabelle III. Zahl der dissoziablen Gruppen pro Eiweiss molekel (COHN - EDSALL) (8).

Die dissoziierenden Gruppen werden nacheinander neutralisiert Bei der Titration geht man von einem Zustand aus, an dem alle negativ geladenen ionisierbaren Gruppen undissoziiert und all positive Gruppen geladen sind. Dieser Zustand liegt etwa bei dem pH-Wert 2. Zugabe einer Base erzeugt nun durch Bindung von H-Ionen negativ geladene Gruppen. Beim isoionischen Punkt sind alle negativen Gruppen dissoziiert. Titriert man nun weiter, so geben die positiv geladenen Gruppen Wasserstoffionen ab, bis bei höchsten pH-Werten (cà 12) keine positiven, sondern nur noch negativ geladene Gruppen vorliegen (13).

Steiler Verlauf der Titrationskurve bedeutet Anhäufung von dissoziierenden Gruppen in dem betreffenden pH-Bereich. Im allgemeinen bleibt die Kurve eines Eiweißes wie schon aus den pK-Werten ersichtlich über den ganzen pH-Bereich mehr oder weniger stark gegen die pH-Achse geneigt. Da z.B. das Albumin pro Molekel 100 Glutaminsäure-COOH-Gruppen aufweist, verläuft seine Titrationskurve im Bereich des pH-Wertes 4,4 steiler als die des Eieralbumins, das nur 50 Glutaminsäuregruppen besitzt (Tabelle III).

Es gelingt relativ leicht, die einzelnen Pufferungsbereiche bestimmten Gruppen im Eiweiß zuzuordnen, indem man die Dissoziation bestimmter Gruppen verändert und so aus der Veränderung der Titrationskurve Rückschlüsse auf die Zusammensetzung eines Eiweißes zieht. So konnte gezeigt werden, daß bei der Titration von Gelatine verschiedene Titrationskurven auftraten, je nachdem, ob sie in Wasser, Alkohol oder 1%igem Formaldehyd gelöst war. (27) Es spielen sich an allen freien NH_2-Gruppen Reaktionen mit Formaldehyd ab, indem dieses ihre Basenfunktion ausschaltet.

Auf diese Art behandelte Proteine zeigen die entsprechenden Veränderungen in der Bindungskurve genau an der zu erwartenden Stelle. Einfacher gesagt, sind alle Aminosäuren, deren pK-Wert über 5 liegt, in einer formaldehydhaltigen Lösung stärkere Säuren als in reinem Wasser (Abb.5).

Ebenfalls konnte aus einer Veränderung der Titrationskurve abgeleitet werden, in welchem Bereich und an welchen Gruppen Metalle zur Bildung von Komplexen mit Anionen neigen: denn bei der Salzbildung in Gegenwart des Metalls verschwindet das Anion, aber nicht das aus der Dissoziation stammende H-Ion. Die Titrationskurve verläuft daher bei Komplexbildung um so tiefer, je größer die Tendenz zur Bildung eines Komplexes ist, denn zur Erreichung des gleichen pH-Wertes wie in einer Kontrollkurve ohne metallische Komplexbildner, wird eine entsprechend größere Menge an Alkali zur Neutralisierung der Säure gebraucht werden.

So ist aus einer Arbeit von M.GREENBERG über die Reaktion zwischen Calcium und Proteinen zu entnehmen, daß M.LEAN und HASTINGS 1935 zeigen konnten, daß pKCa x Protein, gewonnen aus Messungen am Serum, Ascites und Pleuraexsudat mit einem Wert von 2,22, mit einer Abweichung von 0,07, völlig konstant ist, wobei vorausgesetzt wurde, daß das Globulin-Albumin-Verhältnis in den oben genannten Flüssigkeiten annähernd konstant blieb. Quotient 1,8 (15).

DUKE, BIER und NORD (32) fanden, daß Calsium die Carboxylgruppen des Trypsins zwischen pH 3,5 und 5 beeinflußte, ihre Disso-

ziation von H^+-Ionen zu verstärken und schlossen daraus, daß dieses durch Ca-Chelatbindung mit den Carboxylgruppen bewirkt wird. Bei einem pH-Wert, der unter 3 liegt, verschwi det die stärkere Säuerung, da eine Chelatbindung mit undisso ziierten Gruppen nicht möglich ist. NANNINGA (1954) machte eine ähnliche Beobachtung bei der Titration von L-Meromyosin in der Gegenwart von Magnesiumionen.

STEINHARDT sowie FUGITT und HARRIS (32) fanden, daß die Titration von Keratinwolle mit einer großen Anzahl verschiedener Säuren eine Serie vollkommen verschiedener Titrationskurven ergab, deren Lage auf der pH-Skala von diesen Forschern auf die verschiedenen Affinitäten der Anionen dieser Säuren zu dem Eiweiß bezogen wurde. Ein ähnliches Bild ergaben Titrationskurven am Eieralbumin. Die beobachteten Abweichungen können annähernd dahin gedeutet werden, daß man die Bindung der Anionen und ihre Wirkung auf die Senkung der positiven Ladungen des Proteins bei einem bestimmten pH-Wert annimmt, eine Tatsache, die wiederum eine Vergrößerung der H^+-Ionen bewirkt, welche bei diesem pH-Wert gebunden wurde.

Diese Tatsache hat für die Titration der Plasmaproteine in sofern Bedeutung, als nach WURMANN und WUNDERLY (36) die Plasmaproteine ebenfalls die Eigenschaft besitzen, bluteigene Kationen in nicht diffusibler Form zu binden. Besonders gut sind diese Bindungsverhältnisse wie schon erwähnt beim Serumcalcium untersucht worden.

Ein ausgezeichneter Überblick über die verschiedenen Titrationsmethoden wurde 1938 von CALVERY verfaßt. VAN SLYKE, KIRK und RICHARDSON geben wertvolle Vergleiche der verschiedenen Methoden (24).

Von JRVING und KLOTZ 1952 (17) wurden Untersuchungen über die Bindung von Kupferionen an das Albumin durchgeführt.

Weitere Untersuchungen von A.GROLLMAN (27) haben gezeigt, daß ebenso organische Anionen mit den Eiweißmolekülen in einer Lösung reagieren, und zwar ebenso auf der basischen als auch auf der sauren Seite ihres Isoelektrischen Punktes.

Genauere Untersuchungen wurden am Rinderalbumin mit zwei Azosulfonsäuren durchgeführt. (28) (18). Wieweit die Bindung organischer Säuren die Titrationskurve des menschlichen Albumins betrifft, ist daraus allerdings nicht zu entnehmen. WHITE (36) hat spektrometrisch die Bindungskapazität für Bilirubin gemessen und berechnet, daß pro Molekül Albumin 25 - 5o Moleküle Bilirubin gebunden werden. An dieser Stelle sei auch auf die ausführlichen Arbeiten von BENNHOLD über die Transportfunktion der Albumine verwiesen.

Titrimetrische Untersuchungen am Humanalbumin.

Was nun für die Titration des Blutplasmas und die Auswertung der Kurven von größerer Bedeutung ist, sind die bereits erwähnten Untersuchungen speziell am Humanalbumin. Viele Untersuchungen am Albumin des Menschen, aber auch an anderen Eiweißen des menschlichen Blutes, haben in den letzten Jahrzehnten neue Erkenntnisse über die Reaktion des menschlichen Eiweißes erbracht. Eine ausführliche Zusammenstellung der Literatur bis 1942 über die Dissoziation der Eiweiße wurde von COHN und EDSALL 1943 gegeben. Der gegenwärtige Stand der Erkenntnisse basiert hauptsächlich auf Titrationen von Eiweißen durch starke Säuren und Basen.

Von diesen Titrationskurven, die nach 1942 veröffentlicht wurden, sind die wichtigsten in Tab.IV angegeben:

Fibrin (im Blutplasma)	FERRY und MORRISON	1945
Casein	HIPP, GROVES und Mc.MEEKIN	1952
Collagen	BOWES und KENTEN	1948
Fibrinogen (vom Rind)	SCHEELMANN und FERRY	195o
Fibrinogen	CHAUDHURI	1948
Fibrinogen u. Fibrin (Rind)	MIHALYI	1954
Gelatine	ROUSSELOT	1944
Insulin (Zinkfrei)	TANFORD und EPSTEIN	1954
Insulin (mit Zink)	TANFORD und EPSTEIN	1954
Serumalbumin (Mensch)	TANFORD	195o
Serumalbumin (Rind)	SHORE	1953
Globin, ferri Haemoglobin u.Derivate(vom Rind)	THEORELL	1943

Hämoglobin (Pferd)	STEINHARDT, ZAISER	1951
Wollekeratin	STEINHARDT, ZAISER	1950

Tabelle IV: Titrimetrisch erfasste Proteine.

Die Titrationen am Albumin, zinkfreiem Insulin und Wollekeratin waren voll reversibel.
Titrationen mit schwachen Säuren, wovon in dieser Arbeit nicht die Rede sein soll, wurden 1935 von STEINHARDT, FUGITT und HARRIS durchgeführt.
Aus dieser Fülle von Untersuchungen seien nur die wichtigsten Tatsachen für das Albumin herausgegriffen, da dessen Titrationskurven bei der Deutung der Titrationskurven des Blutplasmas die wesentlichste Rolle spielen.
Es ist schon seit langem bekannt, daß die elektrische Ladung des Albumins (wie bei allen amphoteren Elektrolyten) von den im Dispersionsmittel herrschenden Bedingungen, insbesondere dem pH und der Ionenstärke, abhängig ist.
Die Ionenstärke ist nach WURMAN und WUNDERLY definiert als die halbe Summe der Ionenkonzentration, wobei jede Ionenkonzentration multipliziert wird mit dem Quadrat ihrer Wertigkeit.
Für 0.01 molare Lösung von NaCl, $MgSO_4$ und H_2SO_4 wird die Ionenstärke auf folgende Weise berechnet.

$$/2 = 0.01\ NaCl = 0.01 \times 1^2 + 0.01 \times 1^2 = 0.02$$
$$= 0.04\ MgSO_4 = 0.01 \times 2^2 + 0.01 \times 2^2 = 0.08$$
$$= 0.03\ H_2So_4 = 0.01 \times 1^2 + 0.01 \times 1^2 + 0.01 \times 0.01 \times 2^2 = 0.06$$

Die neueste und ausführlichste Arbeit über das Säure-Basengleichgewicht am Serumalbumin ist von TANFORD (1950). Ein Aufsatz über "La physicochemie des Serumalbumines" von EDSALL (11) nimmt diese Untersuchungen als Grundlage. Es werden dort die Titrationskurven von Lösungen in Flüssigkeiten verschiedener Ionenstärken besprochen. Die Abbildung 6 zeigt die Hauptformen von Titrationskurven von Lösungen verschiedener Ionenstärken. Die Abszisse h gibt die Anzahl der vom Protein abdissoziierten Protonen als einer Funktion des pH-Wertes an, wobei h = 0 gesetzt ist, wenn das Protein seine höchste positive Ladung hat. Wenn h = 96, ist das Pro-

tein an seinem isoelektrischen Punkt. Nach EDSALL (11) scheinen die Carboxylgruppen des Albumins zwischen pH2 und 5,5 titriert zu sein, d.h. sie haben bis zum pH 5,5 ihre H-Ionen abgegeben. Die Imidazol-Gruppen und Histidin-Gruppen werden zwischen 5,5 und 8,5, die NH_2 des Lysins und die phenolischen Hydroxyl-Gruppen des Tyrosins zwischen 8,5 und 12 titriert. EDSALL faßt das Geschehen in folgender Formel zusammen:

$$pH - \log \frac{h}{99-h} = pK - 0{,}868\ w\ z$$

n ist die Anzahl der Carboxylgruppen, die ihr Proton bei einem bestimmten pH verloren haben.
z ist die mittlere Ladung des Albuminmoleküls.
w ist der Faktor elektrostatischer Kräfte, die das Proton binden oder losgeben.
w ist nun, wie aus der Kurve zu ersehen ist, eine Funktion der Ionenstärke, die sich vermindert, wenn w ansteigt.

Der Effekt bei der Erhöhung der Salzkonzentration ist einfach gesagt der, daß die Titrationskurve um den isoelektrischen Punkt des Albumins rotiert. SÖRENSEN (29) hat diese Tatsache auch an Untersuchungen am Eieralbumin zeigen können. Die Formel nach EDSALL erfaßt dieses Geschehen nun genau quantitativ.
Nach WURMAN und WUNDERLY besitzt das Serumalbumin unter maximalen Bedingungen etwa 200 ionisierte Gruppen (36).
Weitere Untersuchungen über das Wasserstoffionengleichgewicht am nativ- und chemisch abgeänderten Serum-Albumin von STANFORD 1950 haben zusammenfassend folgende Ergebnisse gebracht.
Die Aufnahme des Wasserstoffions war annähernd reversibel von pH 2 bis pH 12.
Die Titrationskurve des Humanalbumins läßt sich annähernd auf der Basis der Aminosäurenanalysen von BRAND erklären, mit der daraus zu folgernden Erwartung, daß die Titrationskurve 200 basische Nitrogen-Gruppen per Mol zeigt.
Die auf theoretischer Grundlage ermittelte Titrationskurve stimmt etwa mit der des Experimentes überein. Die Steilheit der Kurve im sauren Bereich wurde als Zeichen dessen interpretiert, daß das Eiweiß nie eine hohe positive Ladung er-

reicht, wahrscheinlich infolge einer großen Zahl von Chlorionen, die auf der sauren Seite gebunden werden können. Das Studium über die Chloridbindung des Eiweißes bestätigte nach TANFORD diese Annahme.
Die pK-Werte für Carboxyl, Imidazol α-Amino und ε-Amino und phenolische Hydroxylgruppen liegen bei 4.00, 6.10, 800, 9.40 und 9.60. Für das guanidierte Albumin kann eine Kurve mit eben denselben pK-Werten konstruiert werden, wobei jetzt beachtet werden muß, daß alle ε-Aminogruppen in Guanidingruppen umgewandelt sind. Diese Kurve stimmt auch mit der experimentell gewonnenen überein. (siehe Abb. VII).
Bei der iodierten Form des Albumins war im Gegensatz zu den nativ-Albumin-werten entgegen den Erwartungen nur eine geringe Differenz aufgetaucht. Auf die daraus folgernden Ergebnisse soll hier nicht eingegangen werden.
Aus einer Tabelle aus dem Buch "Fortschritte der Biochemie" aus dem Kapitel "Chemie der Proteine" ist die Zahl der in einem Proteinteilchen vom Äquivalentgewicht 100000 gefundenen Aminosäuremoleküle ersichtlich. (16)(Tabelle IV).

Außerdem konnte gezeigt werden, daß Proteine in Lösungen von Harnstoff, Formamid oder Thioharnstoff das mittlere Teilchengewicht verkleinern (35). Man nimmt an, daß diese polaren Stoffe, welche die Dielektrizitätskonstante heraufsetzen, intermolekulare Bindungen der Proteinmoleküle lösen und dadurch deren Löslichkeit erhöhen. In Lösungen von relativ niedrigen Elektrizitätskonstanten ist die Dissoziation der sauren Carboxyl- und Phenol-Gruppen eingeschränkt, da mehr Energie notwendig wird, um das H^+-Ion vom COO^- zu trennen. Die Erhöhung der Dielektrizitätskonstanten erhöht, wie später gezeigt wird, damit auch die Bindungsfähigkeit für Basen.
Zusammengefaßt kann folgendes gesagt werden:

1. Die Dissoziation der reaktiven Gruppen im Albumin wird durch die Gegenwart anderer Elektrolyte stark beeinflußt, da sie die Verteilung der Gegenionen um das Makroion stark beeinflussen (13). Nach LEUTHARDT ändert sich die Titrationskurve des Albumins bei Erhöhung der Salzkonzentration folgendermaßen: Die Punkte auf der sauren

Seite des I.P. werden um wachsende Beträge nach der alkalischen, die Punkte auf der alkalischen Seite um wachsende Beträge nach der sauren verschoben. Eine Erhöhung des Salzgehaltes bewirkt eine Vergrößerung des Bindungsvermögens für Säuren und Basen. (22b)

2. In Lösungen von relativ niedriger Elektrizitätskonstanten ist die Dissoziation der sauren Carboxylgruppen und Phenolgruppen eingeschränkt, da mehr Energie notwendig wird, um das H-Ion vom COO^- zu trennen. (24) Die Dissoziation der Aminogruppen ist davon wenig beeinflußt.

3. Die Plasmaproteine besitzen die Eigenschaft, bluteigene Kationen in nicht diffusibler Form zu binden. Besonders gut untersucht sind diese Bindungsverhältnisse am Serumcalzium.

III. Die verschiedenen Puffersysteme im Blut, ihre Mengenverhältnisse und ihre Bedeutung

Als Puffer wirken im Organismus alle Elektrolyte, die H-Ionen oder OH-Ionen binden können. Daran sind im Blut vornehmlich das Hämoglobin und das Bicarbonatsystem beteiligt. Außerdem haben die Phosphate und Eiweißsysteme einen Einfluß auf die Pufferfähigkeit. Es ist aber nicht zu vergessen, daß sich alle im Stoffwechsel auftretenden Säuren mit geeigneten Dissoziationskonstanten auch als puffernde Substanzen betätigen können (27). Wie aus obigen Ausführungen zu entnehmen, werden die genannten Puffersysteme auch durch das umgebende Ionenmilieu bestimmt, was in Bezug auf diese Arbeit besonders am Eiweiß gezeigt wurde.

Obengenannte Puffersysteme haben nun die Aufgabe, das pH des Blutes ständig zwischen pH 7.3 und pH 7.45 zu halten. Die größte Wirkung haben dabei besonders das Hämoglobin, das Kohlensäure-Bicarbonatsystem, die Plasmaproteine und primäres und secundäres Phosphat.

Nach WURMAN und WUNDERLY verhalten sich diese Puffersysteme bei einem pH von 7.3 und einem Hämoglobingehalt von 16g% an der gesamten Pufferkapazität wie 2.79×10^2 (Hämoglobin)
zu 0.48×10^2 (CO_2)
zu 0.28×10^2 (Proteine)
zu 0.06×10^2 (Phosphate)

Demnach sind die Plasmaproteine, vorzugsweise Albumin und Globuline zu 1/13 an der Pufferleistung beteiligt, die Phosphatgruppe ca. nur noch zu 1/100.

Nach HENDERSON beträgt beim normalen respiratorischen Zyklus die wahre Pufferung durch das Hämoglobin 13% der Änderung im Basenbindungszustand der Blutkörperchen, während 87% auf den O_2-Effekt entfallen.

Die gesamte Pufferung mit Hilfe der Eiweiße macht 18% aus, 82% hiervon kommen auf den O_2-Effekt. Die Gesamtwirkung des Hämoglobins ist für 95% der Basenänderung im Zusammenhang mit dem Transport der Atemgase verantwortlich. Auf die Serumproteine entfallen die übrigen 5% der Pufferung, soweit die Bereitstellung von Alkalizur Bildung von Hydrogencarbonaten in Frage kommt (27).

Da bei der Titration des Blutplasmas lediglich Bluteiweiße und Phosphate von oben genannten Faktoren als Puffer eine Rolle spielen, sei kurz auf diese weiter eingegangen.

Im Gegensatz zu Kohlensäure besitzt unter den im Blut herrschenden Bedingungen jedes Molekül der Blutproteine mehrere Säureradikale, die so schwach sind, daß sie im pH-Bereich des Blutes kaum ionisiert sind. Diese Gruppen nehmen daher an dem Säurebasengleichgewicht des Blutes teil und konkurrieren mit der Kohlensäure um die Base. Im physiologischen pH-Bereich kommt also von der starken Pufferwirkung des Eiweißes nur ein geringer Teil zur Geltung, da wie aus der Tabelle V ersichtlich im Bereich pH 6-8 nur die Imidazolgruppen ionisieren.

Tabelle V,1

Gruppe	Anzahl der Gruppe/Mol.	pK-Wert errechn. u.( )experimentel	Ionisation	Zahl d. Gruppen exper.gew.
Carboxyl	106	4.3 3.6 (4.00)	2- 5.5	1o6
Imidazole	16	6.0 6.7 (6.10)	6- 8	16
Amino	9	7.8 (8.00)	8- 9.5	4
Amino	18	9.7 10.1 (9.40)	9-12.5	56
Phenol-OH	18	9.6 (9.60)	9-12.5	18
Sulfhydril	0.7		11	
Guanidin	24		11	24

Ionisierbare Gruppen im Serumalbumin nach COHN EDSALL (8).

Genauere Messungen an den Globulinen liegen noch nicht vor. Es ist aber aus dem Verhältnis der Zahlen der einzelnen Aminosäuren von Albumin und Globulin aus der Tabelle IV ersichtlich, daß sie sich in ihrer Titrationskurve unterscheiden. (pK-Wert des Albumins 4.9; pK-Wert des Globulins 5.2 - 6.1)

Da das Albumin 133 freie saure und 142 freie basische Gruppen, das Globulin z.B. nur 67 und 100 besitzt, puffert das Albumin demnach stärker und hat das Optimum seiner Pufferung in einem tieferen pH-Bereich. Es ist klar, daß diese Tatsache bei der Auswertung der Plasmatitrationskurven ihre Berücksichtigung finden müssen.

Das Gesamteiweiß besitzt nach WUHRMAN und WUNDERLY (36) eine physiologische Schwankungsbreite von 6.5 - 7.9 g%, davon entfallen auf die Globuline etwa 2 - 3 g%, Albumine 4 - 5 g% und das Fibrinogen 0.15 - 0.40 g%.

Unter pathologischen Bedingungen zeigt nun das Eiweiß starke Abweichungen von diesen Normalwerten, sowohl in seiner Gesamtkonzentration, als auch in dem Verhältnis der einzelnen Fraktionen zueinander. Ob in solchen Fällen von ausgesprochener Dysproteinämie auch die Bindungskräfte des Serumalbumins verändert sind, ist nach WUHRMAN und WUNDERLY (1957) bisher mit Sicherheit nicht entschieden worden. Diese Tatsache hätte

für die Titration des Plasmas eine große Bedeutung, da die Veränderlichkeit der Bindungskräfte natürlich die Titrationskurve beeinflussen müsste.
Eine Hyperproteinämie bezieht sich immer auf eine Vermehrung der Globuline, eine Hypoproteinämie immer auf eine Verminderung der Albumine (12). Je stärker eine Hypo- oder Hyperproteinämie ausgeprägt ist, mit um so stärkeren Verschiebungen ist auch innerhalb der Fraktionen zu rechnen (36).
Für die Beurteilung der Plasmatitrationskurven ist es ausserdem wichtig zu wissen, daß im allgemeinen bei stärkeren Verschiebungen im Gesamteiweiß immer auch der Elektrolythaushalt gestört ist oder wenigstens beachtet werden muß.
Was nun das Phosphatpuffersystem anbetrifft, so sei kurz folgendes angegeben:
Die logarithmische Dissoziationskonstante der Phosphorsäure beträgt bei 38 Grad 6.8 . Daraus ergibt sich für das Blut-plasma bei pH 7.4 ein Verhältnis

$$H_2PO_4 : HPO_4 = 0.2 : 0.8$$

Ein Molekül H_3PO_4 braucht im Blutplasma $0.2 - 2 \times 0.8 = 1.8$ Aequivalent Base (8). Das ist im Verhältnis zu den Eiweissen eine sehr geringe Menge.
Die Konzentration des Phosphates im Blut beträgt unter normalen Bedingungen 2.3 mval./l.
Bei Nephritiden können Konzentrationen bis 4.6 mval./l. und mehr auftreten (Phosphatstau).
Es werden demnach diese beiden Puffersysteme hauptsächlich die Plasmatitrationskurven bestimmen. Aus den obigen Ausführungen wird klar, daß nicht alle Fragen bereits geklärt sind und bei dem Verlauf der Titrationskurve des Blutplasmas nicht alle Beobachtungen bis in das Einzelne erklärbar sein werden.

IV. Eigene Untersuchungen.

Alle Versuche und Untersuchungen wurden mit dem Vollautomatischen Titriergerät POTENTIOGRAPH der Firma Metrom A.G., Herisau, durchgeführt. Für nähere Angaben über Technik, Arbeitsweise und Genauigkeit des Gerätes, sei auf die Arbeit von CONRAD verwiesen.
Bei der Arbeit am Blutplasma war es einmal besonders wichtig, mit möglichst wenig Material auszukommen. Es mußte der Nachteil einer sich vergrößernden Fehlerquote bei Verdünnungen in Kauf genommen werden. Nach verschiedenen Voruntersuchungen zeigte es sich, daß 2 ml Plasma, das durch einige Tropfen Heparin ungerinnbar gemacht wurde, ausreichten, ohne daß eine allzu große Fehlerbreite auftrat.
Zum zweiten galt es, eine Kurve zu gewinnen, die einen möglichst großen pH-Bereich durchlief, denn wie oben ausgeführt, ist nur bei Übersicht über den gesamten Pufferungsbereich eine Aussage über dessen Beeinflussung möglich.
Da die Eiweißfällung am I.P. nach weiterer Säurezugabe reversibel ist und im alkalischen Bereich das Eiweiß nicht ausfällt, wurde ohne Rücksicht auf die Denaturierung der Bluteiweiße als Ausgangs-pH 2.7 gewählt. Damit war es möglich, einen sehr großen Bereich der Pufferung zu überblicken.

Arbeitsvorgang:
Frisch entnommenes, teilweise venöses, teilweise arterielles Blut, wurde nach Messung von pH und Bicarbonat zentrifugiert und das Plasma, sofern sofortige Verarbeitung nicht möglich war, im Eisschrank aufbewahrt. Zur Titration wurden 2 ml Plasma mit einer geeichten Pipette aufgesogen und zu 5 ml einer 0.9 %igen NaCl-Lösung zugegeben (7 ccm Flüssigkeit waren notwendig, um für die Elektrode die erläßliche Eintauchtiefe zu gewinnen). Mit einer 0.1 n HCl-Lösung wurde nun durch tropfenweise Zugabe der pH von 2.7 eingestellt. Bei Erreichung des I.P. trat eine leicht Trübung der Flüssigkeit ein, die sich bei weiterer Senkung des pH wieder löste. An-

schließend wurde jetzt die Titration mit 1/30 n NaOH automatisch von dem Titriergerät vollzogen.

Zur Frage der Genauigkeit und vor allem der Reproduzierbarkeit von Titrationskurven am Blutplasma wurden vom Plasma einer Person mehrfach 2 oder 3 Messungen hintereinander durchgeführt. Dabei zeigten sich nur geringgradige Abweichungen.

Um ein Maß für die Beeinflußbarkeit der Titrationskurve des Bluteiweißes für den eigenen Meßbereich zu erhalten, wurden verschiedene Untersuchungen am Humanalbumin durchgeführt. Über das zur Verfügung stehende Humanalbumin wurden einige Angaben an den Schluß der Arbeit gestellt.

Wie oben ausgeführt, ist der Verlauf der Titrationskurve des Serumalbumins von folgenden Faktoren abhängig:

1. Ionenstärke
2. Dielektrizitätskonstante
3. Bildung von Metallkomplexen und Bindung organischer im Blut befindlicher Stoffe
4. Proteinkonzentration
5. Temperatur

Da der Puffer des Plasmas wie oben erläutert, abgesehen vom Bicarbonatsystem, vom Eiweiß gestellt wird, mußten diese Faktoren auch die Titrationskurve des Blutplasmas bestimmen.

Zum Nachweis der Abhängigkeit der Titrationskurve von der Ionenstärke wurde Humanalbumin in steigenden Konzentrationen von NaCl-Lösungen gegeben und dann über einen pH-Bereich von 2.7 bis ca. pH 11 mit 1/20 NaOH titriert. (Abb.8 u.Tabelle V).

Es ist aus der Abbildung deutlich ersichtlich, daß die Titrationskurve um den Bereich des Isoelektrischen Punktes rotiert. Wie aus der Tabelle ablesbar, nimmt die Steigung zwischen pH 3 und 4 mit steigender Ionenstärke (hier als Osmolarität angegeben) bis zur Osmolarität des Blutes zu, dann bei weiterer Erhöhung der Ionenstärke in demselben Maße wieder ab.

Die Steigung zwischen pH 4.5 und 5.5, ebenso der NaOH-Verbrauch, nehmen mit wachsender Osmolarität kontinuierlich zu.

Die Punkte auf der sauren Seite des I.P. werden um wachsende Beträge nach der alkalischen, die Punkte auf der alkalischen nach der sauren Seite verschoben.

Da wie oben ebenfalls ausgeführt, Harnstoff einen wesentlichen Einfluß auf die Elektrizitätskonstante des Blutes hat und seine Konzentration im Plasma erheblich schwankt, wurde dessen Beeinflussung der Titrationskurve geprüft. Abb.9

Mit Erhöhung des Harnstoffgehaltes ist eine deutliche Erhöhung der Pufferfähigkeit des Albumins zu erkennen. Dieses kommt vor allem darin zum Ausdruck, daß die Steigung der Titrationskurve zunimmt. Im Gegensatz zur Abhängigkeit der Titrationskurve von der Ionenkonzentration trat durch die Erhöhung des Harnstoffgehaltes keine Verschiebung der Titrationskurve zur alkalischen bzw. sauren Seite auf. Die Erhöhung der Pufferfähigkeit als Ausdruck der Steilheit der Titrationskurve wird lediglich im pH-Bereich 3 bis 4 deutlich. Eine wesentliche Zunahme der Steigung zwischen pH 4.5 und 5.5 ist nicht zu beobachten.

Da, wie bereits öfter betont, steiler Verlauf der Kurve Häufung von dissoziierenden Gruppen im betreffenden pH-Bereich bedeutet, konnte mit diesen Versuchen gezeigt werden, daß das Eiweiß auch im eigenen Meßbereich bei den gegebenen Konzentrationen des Blutplasmas, deutlich in seiner Dissoziation beeinflußt werden kann, und diese Beeinflussung auch bei der Auswertung von Titrationskurven des Blutplasmas eine wesentliche Rolle spielt, wenn auch quantitativ in weit geringerem Maße.

Auf die Beeinflußbarkeit der Titrationskurve durch Bildung von Metallkomplexen mit Humanalbumin konnte im vorliegenden Meßbereich kein sichtbarer Einfluß experimentell erwiesen werden. Wie aus den obigen Ausführungen ersichtlich, wären dazu kompliziertere Verfahren notwendig.

Sehr einfach ließ sich die Abhängigkeit der Titrationskurve von der Eiweißkonzentration nachweisen. Zu einem Blutplasma bekannter Eiweißkonzentration wurden bestimmte Mengen an Humanalbumin zugegeben. Außerdem wurden Eiweißmengen geringerer als im Blutplasma vorkommender Konzentrationen vorgelegt. (s. Tabelle VI.).

Die Abhängigkeit der Steigung der Titrationskurve von der Eiweißkonzentration war im pH-Bereich 3 bis 4 weitgehend linear. Da also eine weitgehend lineare Abhängigkeit zwischen Eiweißkonzentration und Steigung der Kurve bestand, war ein gewisses Maß für die Pufferfähigkeit des Plasmas bei bekannter Eiweißkonzentration gefunden und eine Aussage möglich, ob eine Vergrößerung oder Verkleinerung der Pufferfähigkeit vorlag.

Der Einfluß der Temperatur auf die Titrationskurve fand keine Beachtung, da alle Untersuchungen bei weitgehend konstanten Temperaturen stattfanden.

Auswertung der Titrationskurven des Blutplasmas

Es wurden 20 Messungen an gesunden Personen und 50 Kurven von Patienten ausgewertet. Das Plasma stammte von Patienten, bei denen eine kompensierte oder auch dekompensierte Acidose oder auch Alkalose anzunehmen war. Es wurde dabei auch besonders auf das Plasma von Patienten Wert gelegt, bei denen eine Erhöhung des Anionenrestes und des Harnstoffs gegeben war.

Nach GAMBEL (14) war durch die Verschiebung des Anionenrestes oder die Vermehrung von Ketosäuren eine Beeinflussung der Titrationskurve zu erwarten.

Abbildung 11 gibt zunächst eine Übersicht über die erzielten Variationsmöglichkeiten der Titrationskurven ohne auf einzelne Plasmawerte vorerst näher einzugehen.

Aus den Kurven sind folgende Tatsachen ablesbar:

Der schraffierte Bereich gibt die Zone an, in der die Kurven des Plasmas gesunder Personen verlaufen. Es ist dabei auffäl-

lig, daß sich der Streuungsbereich bei pH 5.5 erheblich verbreitert, während die Kurven im sauren Bereich des pH-Wertes weitgehend übereinstimmend verlaufen. 4 Kurven von Patienten wurden nun den Kurven der gesunden Personen gegenübergestellt. Die Kurve 25 in Abb. 13 eines Patienten mit starker Hypoproteinämie zeigt deutlich, welche Hauptrolle das Eiweiß bei der Pufferkapazität des Plasmas spielt. Sowohl bei der Kurve Nr. 10 eines Patienten mit chronischer Nephritis als auch bei Kurve Nr. 26, dem Plasma des Patienten mit Hypophyseninsuffizienz, wird man eine Erniedrigung des Plasmaeiweißes annehmen können. Es fällt jedoch auf, daß die Kurve Nr. 9 des Patienten mit chronischer Urämie mit Harnstoffwerten über 200 mg im Bereich der Normalkurven verläuft, obwohl im Falle einer chronischen Urämie an eine verringerte Plasmaeiweißkonzentration gedacht werden muß als Folge des chronischen Nierenschadens.

Bei genauerer Beobachtung ist jedoch nicht allein ein Unterschied im Verbrauch an Titrationsmittel auffallend. Auch im Verlauf der Titrationskurve zeigen sich deutliche Unterschiede. Es fallen besonders zwei Kurvensysteme bzw. -typen ins Auge, wobei hauptsächlich in der Steigung der Kurve zwischen pH 4.5 und 5.5 Unterschiede auftraten. Da steiler Verlauf der Titrationskurve Häufung von dissoziierenden Gruppen bedeutet, ist in diesem Bereich die Dissoziation veränderlich. Bei der Kurve des einen Types ist die steilste Strecke der Titrationskurve von Beginn an festzustellen, bei pH 4.5 nimmt sie langsam und stetig ab, bis bei pH 7 bis 8 eine Wendung der Rechtskurve in eine Linkskurve eintritt, die sich asymptotisch der Vertikalen nähert. Bei den Kurven des zweiten Types erreicht die Steigung ihren höchsten Wert erst in einem pH-Bereich von ca. 5. Drei Wendepunkte sind ersichtlich. Die Titrationskurve beginnt mit einer Linkskurve, wendet sich nach rechts im Bereich des Isoelektrischen Punktes des Albumins und der Globuline, bis sie zwischen pH 7 und 8 wieder in eine Linkskurve übergeht und sich damit wieder dem Kurvenverlauf des ersten Types anschließt.

Kurve Nr. 9 und Kurve nr. 10(Abb. 11) sowie die Mehrzahl der Normalkurven gehören dem ersten Verlaufstyp, Nr. 26 und Nr. 25 dem zweiten an.

Dieser Verlaufsunterschied läßt sich nicht dadurch erklären, daß der Kurvenverlauf wie experimentell gezeigt wurde, durch die verschiedene Ionenstärke beeinflußt wird. Die Osmolarität des Plasmas zeigt nicht so starke Unterschiede wie sie experimentell erzeugt werden mußten, um eine Veränderung der Titrationskurve zu erzielen. (Abb.8)

Daß dieser Kurvenverlauf jedoch auf einem mehr oder weniger konstantem Zustand des Plasmas beruht, zeigen die Beispiele auf den Abbildungen 10, 12, 14 und 15. Abbildung 14 zeigt die auf Abbildung 11 wiedergegebene Kurve Nr. 26 des Plasmas einer Patientin mit Hypophyseninsuffizienz, aufgezeichnet im Verlauf einiger Tage am frisch gewonnenen Plasma. Es wurden je eine Messung am 6., 8. und 17. April 1963 durchgeführt. Wenn sich auch gewisse Änderungen im Verbrauch an Titrationslösung aufzeigen lassen, so bleibt doch der charakteristische Verlauf der Kurve mit 3 Wendepunkten und stärkster Pufferwirkung im Bereich 4.5 und 5.5 erhalten. Dasselbe Ergebnis zeigt Abbildung 12. Dort ist die Kurve eines Patienten mit chronischer Ateminsuffizienz im Verlauf einiger Tage wiederholt aufgezeichnet worden. Das Beispiel auf Abbildung 17 zeigt den Kurvenverlauf des ersten Types. Es ist die Plasmakurve einer Patientin mit chronischer Nieren-Insuffizienz. Die Kurven wurden geschrieben am 29. März, 8. und 15. April. Sie zeigen bis auf die Abweichungen im Verbrauch an Titrationsmittel den typischen Verlauf der Kurve des ersten Types. Wie weit die Kurve eines gesunden Probanden in ihrem Verlauf in der Zeit vom 27. 3. bis zum 27. 11. veränderlich ist, zeigt Abbildung 14. Aus 5 Messungen wurden 3 Extremwerte ausgewählt (s.Abb.12). Der Streuungsbereich stimmt etwa mit dem überein, der aus Messungen von 20 gesunden Personen ermittelt wurde.

Um nun jedoch genauere Aussagen über die Pufferkapazität des Blutplasmas verschiedener Patienten machen zu können,

war es notwendig, die Steigung der Titrationskurve in den einzelnen pH-Bereichen, den Verbrauch an Titrationsmittel, den Plasmawerten gegenüberzustellen. In erster Linie war es wichtig, die Plasmaeiweißwerte in Korrelation zur Steigung der Titrationskurve, die ja ein Mass für den Puffereffekt darstellt, zu bringen.

Denn wie aus Abbildung 13 zu ersehen, bestand bei den Plasmakurven verschiedener Patienten keineswegs eine Proportionalität zwischen Plasmaeiweissmenge und Pufferkapazität. Die Gegenüberstellung einiger Plasmatitrationskurven mit Angabe von Diagnosen und Plasmaeiweisswerten zeigt deutlich, daß die Kurven 103 und 30 im pH-Bereich zwischen pH 3 und 4 einen höheren Steigungswert besitzen als Nr. 11 und Nr. 50, obwohl ihre Eiweißwerte unter denen von Nr. 11 und Nr. 50 liegen.(siehe Abb. 13).

Relativ gesehen ist es nicht nur die Steigung zwischen 3 und 4, sondern auch der Verbrauch an Titrationsmittel, der bei beiden Kurven, Nr. 74 und Nr. 30, im Verhältnis zum Eiweißwert erhöht ist.
Im Folgenden wird als Mass der Pufferwirkung des Plasmas vorerst nur die Steigung zwischen pH 3 und 4 berücksichtigt, da in diesem Bereich die Beeinflussbarkeit der Dissoziation des Plasmaeiweisses am stärksten zum Ausdruck kommt.

Die Ablesung der Steigung der Titrationskurve zwischen pH 3 und 4 gibt einen Überblick über den Puffereffekt nicht nur in diesem pH-Bereich, sondern auch weitgehend über den des Gebietes höherer pH-Werte. Da die Titrationskurve zu Beginn ihres Verlaufes zumeist ihre höchsten Steigerungswerte erreicht, liegt es nahe, daß damit dieser Anfangssteigungswert auch Rückschlüsse auf den Gesamtverbrauch bei pH 7 zulässt. Ein Vergleich von Abb. 16 und Abb. 17 zeigt, daß die Erhöhung des Puffereffektes zwischen pH 3 und 4 stärker zum Ausdruck kommt, da wie schon gezeigt wurde (Abb.9) Harnstoff nur die freien COOH-Gruppen beeinflusst, während die Aminogruppen des Eiweisses unbeeinflusst bleiben. Da außerdem die Normalkurven im pH-Be-

reich 3 bis 4 die geringsten Streuwerte zeigen, d.h. ihre Kurven fast deckungsgleich verlaufen, macht sich ein Abweichen von Normalwerten dort am stärksten bemerkbar.

Um genaue Vergleichsmöglichkeiten zu haben, wurden die Kurven auf folgende Art ausgewertet:
Steigung von pH 3 bis pH 4 und pH 4.5 bis 5.5 sowie der Verbrauch an Titrationsmittel bei pH 7 und 9 wurden tabellarisch den Eiweißwerten, dem Bicarbonat und vor allem dem Harnstoffgehalt des Plasmas gegenübergestellt. (s. Tabellen VII - IX).

Das Steigungsmaß entspricht dabei dem tg des durchschnittlichen Verbrauches an NaOH zwischen den entsprechenden pH-Werten.

Es zeigte sich nun bei Gegenüberstellung der Plasmaeiweißwerte mit den Werten der Steigung der Titrationskurve zwischen pH 3 und 4, daß bei einer Gruppe von Patienten dieser Wert, der ja ein Maß für die Pufferkapazität in diesem Gebiet ist, erniedrigt war, eine andere Gruppe einen erhöhten Wert zeigte. Erhöhung und Erniedrigung dieses Wertes entsprach auch weitgehend der Pufferkapazität des Plasmas überhaupt.

Bei einer dritten Gruppe entsprach dieser Wert, wie es auch im Experiment gezeigt werden konnte, der Konzentration des Plasmaeiweißes. Es bestand also Proportionalität.

Die Gruppe mit erhöhten Steigungswerten im Bereich zwischen pH 3 und 4 waren ausnahmslos Patienten mit erhöhten Harnstoffwerten (über 150 mg%), obwohl ja ihr Plasmaeiweiß in jedem Fall unter den Normalwerten lag.

Auf der Abbildung 16 wurden 10 Werte von Patienten mit Niereninsuffizienz und erhöhten Harnstoffwerten im Serum 10 anderen Krankheitsbildern gegenübergestellt, bei denen die Pufferfähigkeit herabgesetzt war. Auf der Abszisse sind die Steigungswerte der Titrationskurve in mm/25 mm zwischen pH 3 und 4 angegeben. Wie oben angegeben, entspricht dieser Wert dem Puffereffekt des Plasmas und ist definiert als der

tg der Kurve im pH-Bereich 3 - 4. Die Ordinate gibt die Plasmawerte des Eiweißes in g% der Norm an. Die experimentell ermittelte lineare Abhängigkeit von Plasmaeiweißkonzentration und Steigung wurde eingezeichnet. Die in der Nähe dieser Linie liegenden Werte können als normale Werte betrachtet werden. Die eingezeichneten Punkte tragen je eine Nummer, die mit der auf der Tabelle in Klammern gesetzten zu vergleichen ist und das Plasma der verschiedenen Patienten bezeichnet.

Die schraffierte Fläche gibt den Bereich an, in dem die Plasmakurven gesunder Probanden verlaufen. Entsprechend liegen auch die Steigungswerte der gesunden Personen alle über 76.

Es ist aus der Abbildung weiterhin deutlich zu ersehen, daß bei Erhöhung harnpflichtiger Stoffe trotz Erniedrigung des Plasmaeiweißes die Steigung der Kurve einen Wert erreicht, der dem der Normalkurven oft gleichkommt, allenfalls über denen von Acidosen anderer Genese liegt.

Die Pufferkapazität des Plasmas (Pufferkapazität hier der Steigung der Titrationskurve zwischen pH 3 und 4 gleichzusetzen) mit erhöhten harnpflichtigen Stoffen ist also, trotz Erniedrigung des Blut pH, den Acidosen anderer Genese gegenüber erhöht.

Vergleichen wir in Abb. 16 und 17 die eingezeichneten Werte mit Krankheitsbildern, so stellt sich heraus: Punkte oberhalb und rechts von der Linie, die die lineare Abhängigkeit von Steigung und Eiweißkonzentration darstellt, entsprechen folgenden Krankheitsbildern: 4 x Chron. Nephritis, 1 x Urämie bei Pyelonephritis, 6 weitere Urämien, 1 x Amyloidnephrose, 1 x diab. Glomerulosklerose. Somit alles Krankheitsbilder, bei denen ein hochgradiges Nierenversagen im Vordergrund steht. In diesen Fällen zeigt also das Blutplasma im Verhältnis zu seinem Eiweißgehalt eine erhöhte Fähigkeit H^+-Ionen abzupuffern. Je mehr die einzelnen Punkte nach oben wandern, umso höher ist ja der Puffereffekt des Plasmas.

Dem gegenüber stehen weiter links, unterhalb der Linie, die die lineare Abhängigkeit von Steigung und Eiweißkonzentration darstellt, Krankheitsbilder folgender Art: chron. Ateminsuffizienz, Herzinsuffizienz, Vorhofseptumdefekt, Corpulmonale, absolute Arrhythmie, Fallotsche Tetralogie, Pankreatitis, Nephritis ohne Harnstofferhöhung usw. Es ist deutlich, daß in diesen Fällen die erniedrigte Pufferfähigkeit einer respiratorischen Insuffizienz oder erniedrigten Albuminwerten gegenüber den Globulinen zugewiesen werden muß. Wenn die Steigungswerte dieser Gruppe in vielen Fällen gleich hohe Werte zeigen, wie die der Gruppe von Niereninsuffizienzen, dann liegt das daran, daß im Falle einer Atem- oder Herzinsuffizienz die Bluteiweißwerte normal sind. Auf den Eiweißwert bezogen, puffert das Plasma des Niereninsuffizienten doch besser.

Hieraus läßt sich der Schluß ziehen, daß die Messung des pH-Wertes nicht immer ein absolutes Maß für die Säuerung des Blutes und eben besonders des Plasmas ist. Das Plasma eines Niereninsuffizienten hat mehr H^+-Ionen abgefangen, als es sein pH-Wert anzeigt. Das Eiweiß ist in diesem Falle aufnahmefähiger.

Im Gegensatz dazu scheint das Eiweiß im Falle einer Ateminsuffizienz aber auch bei Absinken des Albumins gegenüber den Globulinen in seiner Aufnahmefähigkeit für H^+-Ionen schneller erschöpft zu sein, als das Eiweiß des Gesunden.

Bei den Titrationskurven mit erniedigter Steigung zwischen pH 3 und pH 4 muß allerdings berücksichtigt werden, daß bei den meisten die größte Pufferfähigkeit erst im Bereich von 4.5 und 5.5 auftritt, so daß der NaOH-Verbrauch nicht so stark erniedrigt ist wie der Steigungswert. Zwischen pH 3 und 4. Dennoch liegt der NaOH-Verbrauch bei pH 7 und pH 9 niedriger und beim Plasma mit vermehrtem Harnstoff höher als bei Kurven, deren NaOH-Verbrauch der Menge ihrer Plasmaeiweißwerte entspricht. (s.Abb.17).

Eine Einschränkung der Bewertung der Kurven ist noch zu berücksichtigen, dadurch, daß das Plasma nicht nur aus Albumin, sondern auch aus Globulinen besteht. Es wurde oben dargestellt, inwieweit sich diese Eiweißfraktionen in ihrer Pufferfähigkeit unterscheiden.

So wurde in Abb. 10 die Titrationskurve des Humanalbumins der des Plasmas gesunder Personen gegenübergestellt. Bis etwa pH 5.5 verläuft die Kurve des Humanalbumins steiler als die des Blutplasmas. Das ist der Bereich, in dem die COOH-Gruppen dissoziieren. Der größere Steigungswinkel der Kurve erklärt sich einfach daraus, daß prozentual der Albumingehalt im Plasma geringer ist. Die restliche Menge an Eiweiß im Plasma wird ja durch die Globuline gebildet, die ihren Isoelektrischen Punkt in einem höheren pH-Bereich haben. Außerdem besitzen die Globuline 67 die Albumine 133 freie COOH-Gruppen. Zwischen pH 5.5 und ungefähr pH 9 puffert Albumin im allgemeinen nur sehr gering. Die Steilheit der Plasmatitrationskurve ist deshalb in diesem Gebiet durch andere Pufferfaktoren bedingt. Da die Niereninsuffizienz meist eine Erniedrigung des Albumins bedingt, wird hierdurch die Erhöhung der Pufferkapazität bei diesen Patienten noch unterstrichen.

So zeigt z.B. Nr. 74 trotz erheblicher Senkung der Albuminwerteeine Erhöhung des Puffereffektes bei stark gesenktem pH-Wert (7.19).
In einem Fall von Pankreatitis (Kurve Nr. 39), wo weder Harnstoff noch Anionenrest erhöht ist, wird die Erniedrigung der Pufferfähigkeit des Plasmas zum Teil auf eine Erniedrigung des Albumins zurückzuführen sein,(Albumin 27 statt 60%), da der pH-Wert mit 7.39 noch an der unteren Grenze der Norm liegt.

Im Falle einer Pyelitis sinkt die Steigung der Kurve ebenfalls stark ab bei Albuminwerten von 34%. (Keine wesentliche Rest-N Erhöhung).
Kurve Nr. 27 zeigt, daß bei einer cardialen Insuffizienz trotz kompensierter Acidose (pH noch im Bereich der Norm)

die Pufferfähigkeit des Blutplasmas erniedrigt sein kann, bei weitgehend normalen Eiweißwerten und normalem Eiweißquotienten 60/40.
(Elektrophorese: Serumeiweiß 7 g%, Albumine 60%, Globuline α_1 3%, α_2 6%, β 13%, γ 18%).
Bei einem Fall von Diabetes mellitus mit normalen Eiweißwerten (7.1 g%; pH 7.39; Bic. 19mMol) ist die Pufferfähigkeit des Plasmas deutlich herabgesetzt, ohne daß eine Dekompensation des Stoffwechsels vorliegt. Es sei hier noch einmal betont, daß sich diese Aussagen auf die Steigung zwischen pH 3 und 4 beziehen. Gegenüber den Plasmakurven gesunder Personen hat sich der Pufferungsbereich lediglich auf ein anderes pH-Gebiet verschoben wie aus den verschiedenen Kurventypen zu ersehen ist; doch fast immer macht sich diese Tatsache gegenüber jenen Kurven mit erhöhtem NaOH-Verbrauch (siehe Abb. 17) auch in der Verminderung des NaOH-Verbrauches bei pH 7 und 9 bemerkbar.

Wie aus der Zusammenstellung der Elektrolyte und Harnstoffwerte ersichtlich, ist die Erhöhung der Pufferfähigkeit des Plasmas nicht allein auf die Erhöhung des Harnstoffgehaltes zurückzuführen. Denn erstens besteht keine absolute Proportionalität zwischen Harnstoffmenge und Puffereffekterhöhung. Zweitens zeigt die experimentell erzeugte Beeinflussung der Pufferfähigkeit der Albumine und des Plasmas selber, daß diese mit Harnstoffwerten wie sie im Blut vorkommen nur in einem geringen Masse erhöht werden kann.
Da jedoch bei Niereninsuffizienzen oft ein Phosphatstau oder auch eine Erhöhung des Anionenrestes (29) die Pufferfähigkeit erhöht, müssen diese vielleicht einbezogen werden.
Die Auswertung eines Blutplasmas vor und nach extracorporaler Dialyse unterstreicht die bereits gemachten Aussagen. Der Puffereffekt vor der Dialyse war deutlich demgegenüber nach der Dialyse erhöht, obwohl der pH-Wert 7.24 bis pH 7.41 anstieg. Auch nach der Dialyse ist der Puffereffekt entsprechend dem Eiweißgehalt gegenüber Normalwerten noch erhöht, da der Harnstoffgehalt von 428 mg%

lediglich auf 258 mg% zurückgegangen ist. (Tab.Nr. 77).

Es war jedoch nicht möglich, das Phosphat als einzelnes Puffersystem qualitativ und quantitativ aus der Titrationskurve zu bestimmen. Die Dissoziationskonstanten der freien Gruppen des Eiweißes überlagern die des Phosphates. Das zeigt Kurve 74. Trotz stark erhöhter Phosphatwerte hebt sich sein Puffereffekt nicht über den des Eiweißes heraus. Er wird im Kurvenverlauf nicht sichtbar.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der Auswertung der Titrationskurven des Blutplasmas sehr enge Grenzen gesetzt sind, da sie durch viele Faktoren beeinflußt werden und damit sowohl im Verlauf als auch im Verbrauch an Titrationsmittel stark veränderlich sind.

Bei Kenntnis der Eiweißfraktionen, des pH-Wertes und der Menge der harnpflichtigen Stoffe ist allerdings eine zusätzliche Aussage über die Pufferreserven des Plasmas möglich. Wie weit sich die erhöhten Pufferreserven durch Erhöhung des Harnstoffs und des Anionenrestes im physiologischen Bereich auswirken und etwa zur Kompensation einer Acidose beitragen können, läßt sich nach obigen Ausführungen über die Puffer des Blutes und ihr Mengenverhältnis als sehr gering bewerten.

In der Arbeit über den "Säure-Basenhaushalt des Blutes und dessen Erfaßbarkeit" wurde die Aussage gemacht, daß bei der Bestimmung des Puffereffektes außer dem Bicarbonatsystem weitere Pufferfaktoren erfaßbar seien. Durch Aufzeichnung der gesamten Titrationskurve des Blutplasmas konnte über diese Faktoren einiges Nähere ausgeführt werden. Es kann also trotz starker Erniedrigung des pH-Wertes der Puffereffekt des Plasmas gegenüber anderen Acidosen stark erhöht sein, da das Eiweiß durch viele Faktoren u.a. Harnstoff beeinflußt wird. Daneben spielen Anionenresterhöhung z.B. Phosphate zusätzlich eine Rolle.

Zusammenfassung

Es wurde die Frage gestellt, ob über die Bicarbonatpuffer hinaus im Blutplasma noch weitere Puffersysteme qualitativ und quantitativ mit Hilfe der Titrationskurve zu erfassen sind und was ihren Puffereffekt bestimmt.

An Hand von Überlegungen über die Möglichkeiten der Auswertung von Titrationskurven in der Chemie und Biochemie wurden die Faktoren dargestellt, die theoretischerweise auch den Verlauf der Titrationskurve des Blutplasmas bestimmen müssten.
20 Kurven des Plasmas gesunder Personen und 50 Kurven von Patienten wurden geschrieben und kritisch beurteilt. Dabei ergaben sich folgende Ergebnisse:

I.) Die Kurven gesunder Personen zeigen im Bereich zwischen pH 3 und 4 eine geringe Variabilität, dagegen zwischen pH 5 und 9 ein großes Streuungsfeld ihrer Steigungswerte.

II.) Zwischen Eiweißkonzentration und Steigung der Titrationskurve im pH-Bereich 3 bis 4 und dem Verbrauch an Titrationsmittel bei pH 7 besteht eine annähernd lineare Abhängigkeit.

III.) Aus den gewonnenen Kurven der Patienten konnte eine Gruppe herausgestellt werden, deren maximaler Pufferungsbereich bei Versteilerung der Kurve um pH 4.5 und 5.5 gegenüber den Kurven normaler Personen auf der pH-Skala konstant nach rechts verschoben war. Die Kurven des Plasmas mit erhöhten Harnstoffwerten zeigten diesen Effekt nicht.

IV.) Bezogen auf den relativen Eiweißgehalt des Blutplasmas, ist bei Niereninsuffizienz mit Retention harnpflichtiger Substanzen die Pufferkapazität des Plasmas trotz starker Senkung des Blut-pH erhöht.

V.) Bei Patienten, deren Blut-pH erniedrigt und deren Harnstoff nicht erhöht ist, ist die Steigung der Titrationskurve zwischen pH 3 und 4

deutlich erniedrigt. Den gleichen Effekt zeigen Kurven von Plasma, dessen Albumine gegenüber den Globulinen stark vermindert sind.

VI.) Eine Bestimmung des Phosphates war, sowohl quantitativ als auch qualitativ, wegen Überschneidung der pK-Werte der zahlreichen dissoziierenden Gruppen des Eiweisses mit dem des Phosphates nicht möglich.

Tabelle IV

	Serumalbumin (Mensch)	Globulin (Mensch)
Arginin	35	28
Histidin	23	16
Lysin	84	56
Oxylysin	0	0
Ammoniak	63	79
Glutaminsäure	118	80
Asparaginsäure	78	66
Glykokoll	21	56
Valin	66	83
Leucin	91	71
Isoleucin	13	21
Prolin	44	70
Tyrosin	26	38
Phenylalanin	47	28
Tryptophan	1	14
Zystein	6	6
Serin	35	109
Threonin	42	71
Zystin	46	20
Methionin	9	7
freie bas. Gruppen	142	100
freie saure Gruppen	133	67
Summe der Aminosäuren	785	840

Zahl der in einem Proteinteilchen vom Äquivalentgewicht 100.000 gefundenen Aminosäuremoleküle. (16)

Tab. V. Abhängigkeit der Titrationskurve des Humanalbumins von der Ionenstärke.(hier als mosm. angegeben).

Titriermittel 1/2o n NaOH
Die vorgelegte Menge an Humanalbumin entspricht lo mg% Plasmaeiweiss.

Menge an NaCl in der Lösung	in mosmol	Steigung der Kurve z. 3 u.4	4.5 u.5.5	Verbrauch an NaOH in 1/2o ccm be pH 7 und 9	
0	0	71	23	72	85
+ 2o mg	65	8o	26	79	92
+ 45 mg	155	91	32	94	1o7
+ 9o mg	31o	94	37	1o1	128
+ 1oomg	348	93	47	111	127
+ 15omg	516	89	57	118	135
+ 2oomg	688	82	7o	125	14o
+ 25omg	862	77	79	128	143
+ 3oomg	1o34	75	97	137	152

Tabelle VI

Abhängigkeit der Titrationskurve des Blutplasmas von der Eiweißkonzentration

Eiweiß in g %	Steigung z. pH 3 u.4	Steigung z. pH 4.5 u.5.5	Verbrauch an NaOH von pH 3-7	u. 3-9
3.5	45	29	61	82
3.8	48	31	69	92
4.1	51	32	72	95
4.4	57	34	79	103
4.7	59	36	81	108
5.0	62	37	86	114
5.3	65	39	89	116
5.5	66	44	97	129
5.8	73	45	102	136
6.1	74	47	104	139
6.4	79	49	110	148
6.7	80	51	115	155
7.0	83	55	127	168
7.3	85	56	-	-
7.6	87	56	-	-
7.9	91	58	130	166
8.2	93	-	-	-
8.8	100	63	144	182

Die Steigung der Titrationskurve zwischen pH 3 bis 4 gibt den Puffereffekt des Plasmas bei verschiedenen Eiweißkonzentrationen an. Es ist weiterhin die Steigung zwischen pH 4.5 und 5.5 und der Verbrauch an Titrationsmittel bei pH 7 und pH 9 angegeben.

Tabelle VII.

Fall Nr.	Datum	Diagnose	pH	Bic.mmol	Eiweiss in g%	Harnstoff in mg%	Steigung der Kurve zw. pH 3 und 4	4.5 und 5.5	Verbrauch an Titriermittel bei pH 7 und	pH 9 in 1/2o ccm
1.(1)	27.3.	Ateminsuff.bei Lungentb.	7.42	23.o	6.4 g% 4o.9.14.16.21.	22.8 mg%	57	76	113	14o
(14)	1.4.		7.38	23.5			57	76	118	158
(24)	6.4.		7.37	21.5			58	74	119	153
(59)	24.4.		7.36	24.5			57	8o	12o	151
2.(2)	27.3.	z.B.Lunge	7.4o	29.5	8.o 48.4.8.12.17.	norm.	81	62	115	143
3.(3)	27.3.	Herzinsuff.	7.48	23.o	6.o 59.6.9.16.1o.	58.o	72	58	1o8	139
4.(4)	27.3.	Vorhofsept.def.	-	-	6.8 59.4.8.12.17.	norm.	72	6o	119	158
5.(27)	8.4.	Fallotsche Tetralogie	7.38	23.5	7.o 6o.3.6.13.18.	28.o	7o	57	1o4	132
6.(5o)	24.4.	Abs.Arrhythmie	7.39	23.o	6.o 54.5.14.16.11.	56.o	63	5o	1oo	13o
7.(6o)	28.4.	Angina pectoris	7.38	25.o			-	-	-	-
8.(41)	19.4.	Cor pulmonale	7.29	19.5	6.1 41.7.12.2o.2o.	norm.	62	65	11o	145
9.(53)	24.4.	"	7.41	26.o	6.5 39.9.14.24.14.	64.o	64	56	1o3	133
1o.(54)	22.4	"	7.39	21.o	6.4 55.5.1o.14.16.	34.o	73	51	1o8	147
11.(25)	6.4.	Hypoproteinämie	7.5o	26.o	3.3 21.9.3717.16.	28.o	4o	49	82	1o8
12.(26)	6.4.	Hypophyseninsuffizienz	-	17.o	6.2 44.6.14.12.24.	51.o	62	53	1o8	13o
(32)	8.4.	"	-	21.o			67	51	99	126
(37)	17.4.	"	-	2o.5			59	67	1o5	136
13.(36)	17.4.	Pneumonie	-	24.o	6.8 49.5.9.14.23.	8o.o	79	5o	115	148
14.(48)	22.4.	Diab.mellitus	-	27.o	6.o	norm.	75	43	99	137
15.(11)	29.3.	"	7.39	19.o	7.1 54.7.1o.13.16.	norm.	68	6o	12o	161
16.(12)	3o.3.	z.B. Infarkt	-	23.o			78	51	118	157
17.(16)	1.4.	Asthma bronch.	7.36	22.o	6.3 42.1o.13.16.19.	norm.	76	6o	127	174
18.(55)	24.4.	Tetanie	7.36	22.5	7.3 56.4.1o.14.16.	32.o	82	57	119	157
19.(23)	5.4.	Lymphosarkom	-	18.5	6.3 5o.8.12.17.13.	norm.	76	5o	-	-

Tabelle VIII.

Fall Nr.	Datum	Diagnose	pH	Bic. mmol	Eiweiss g%	Harnstoff mg%	Steigung der Kurve zwischen pH 3 und 4	4.5 und 5.5	Verbrauch an Titrationsmittel bei pH 7 und pH 9 in 1/2o ccm 1/3o n NaOH	
2o.(39)	17.4.	Pankreatitis	7.39	22.5	7.3 27.8.15.13.37.	norm.	57	73	129	171
21.(71)	3o.7.	Amyloidose	-	-	4.o 31.6.26.2o.17.	46.o	49	4o	76	96
22.(56)	26.4.	Pyelitis	-	18.o	7.3 34.7.14.17.28.	64.o	7o	41	1o6	148
23.(4o)	17.4.	Nephritis	7.16	12.5			54	76	114	159
24.(38)	17.4.	Gutachten (chron.Nephritis)	-	21.o	6.4 6o.6.7.8.19.	54.o	77	63	122	171
25.(52)	24.4.	Nephritis	-	21.5	7.o 49.7.8.15.19.	34.o	7o	73	123	159
26.(42)	22.4.	Osteoporose	7.39	-	6.7 5o.6.1o.15.19.	norm.	72	79	-	-
27.(43)	19.4.	rez. Lungen-embolien	-	18.o		73.o	62	76	-	-
28.(51)	8.4.	Lebercirrhose	-	-	6.8 42.5.8.16.29.	42.o	83	55	124	164
29.(13)	1.4.	diab. Glomerulo-sklerose	-	14.o	5.1 49.6.12.4.19.	17o.o	68	52	114	159
(29)	8.4.	"	-	14.o			79	45	1o2	125
(47)	22.4.	"	-	14.5		2o6.o	7o	43	98	133
3o.(9)	29.3.	chron.Uraemie	-	22.o	5.9 47.8.14.15.16.	23o.o	92	54	131	172
(31)	8.4.	"	-	17.o		32o.o	92	5o	121	148
31.(5)	27.3.	Nephritis	7.43	-	6.7 47.5.11.1o.27.		83	53	121	155
(22)	3.4.	"	7.3o	15.5			85	59	141	19o
(28)	8.4.	"	7.34	19.5.			84	49	115	144
32.(73)	14.11.	Uraemie	-	-	6.o 5o.1o.15.14.1o.	518.o	96	52	132	169
33.(1o)	29.3.	chron.Nephritis	-	19.o	4.8 5o.6.9.1o.17.	215.o	66	38	9o	12o
(15)	1.4.	"	-	18.5.			67	4o	1o1	142
(3o)	8.4.	"	-	24.o		279.o	72	4o	93	117
34.(72)	14.11.	Uraemie bei Pyelonephritis	7.35	21.1	5.7 46.7.14.14.19	3o4.o	9o	49	12o	154

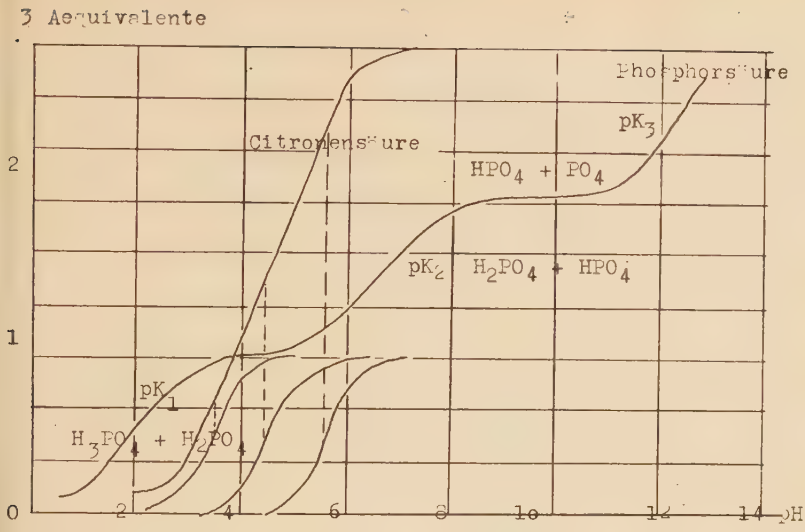


Abb. 1 Titrationskurven von dreibasischen Säuren mit weit auseinanderliegenden (Phosphorsäure) und nahe beieinander liegenden Dissoziationskonstanten (Citronensäure), sowie von 3 einbasischen Säuren. (nach Leuthard)

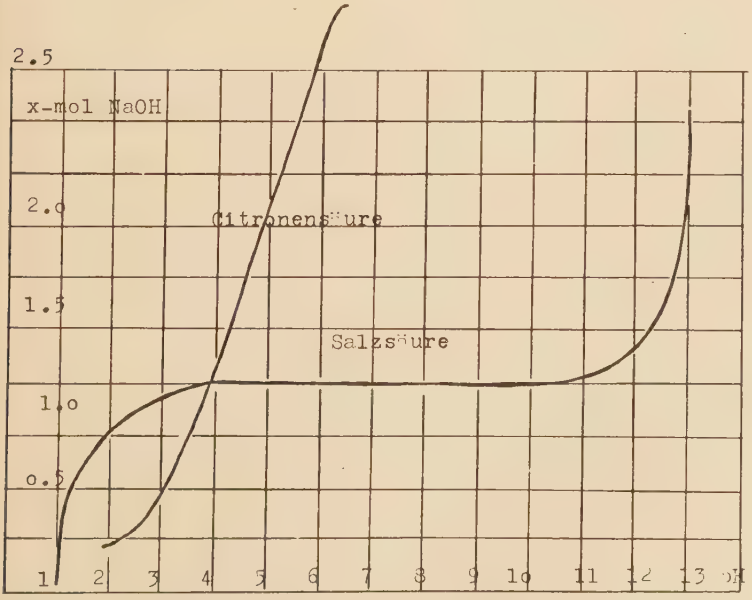


Abb. 2. Beispiel einer puffernden und einer nicht puffernden Säure.

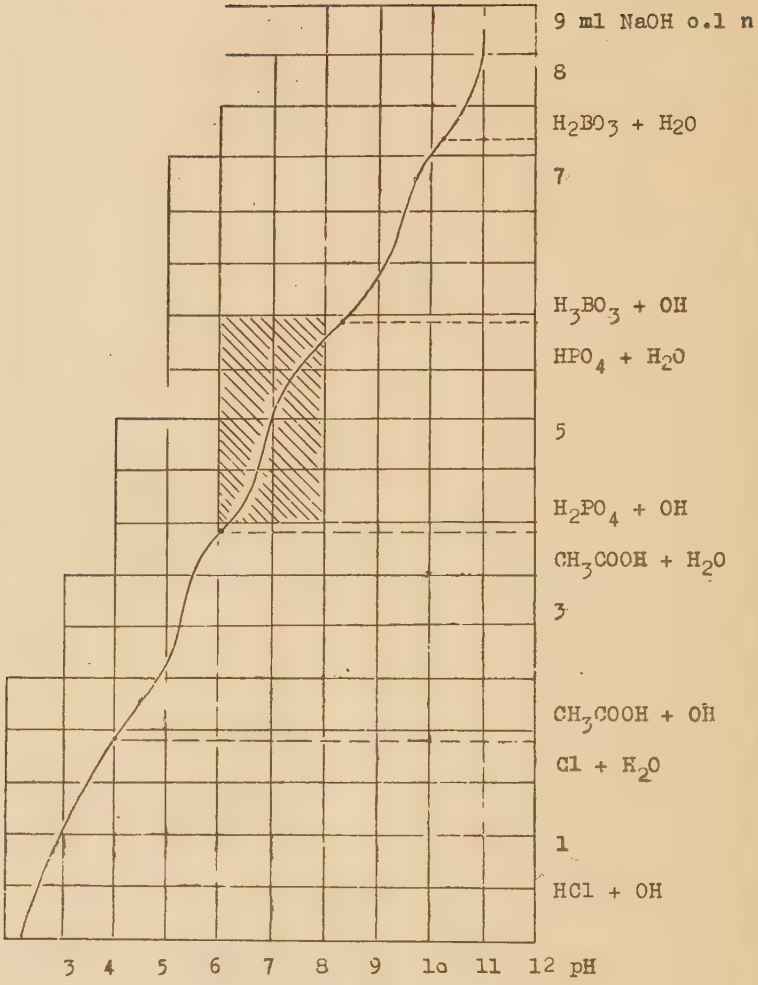


Abbildung 3. Beispiel einer Titrationskurve, bei welcher aus einem Gemisch von 4 Säuren alle pK-Werte und damit alle 4 Säuren bestimmbar sind. (36) Der schraffierte Bezirk entspricht dem Pufferungsbereich der Phosphate im Blut.

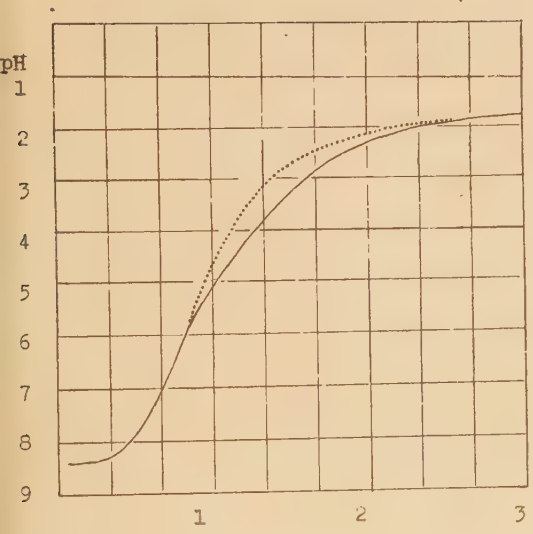


Abb. 4. Titration eines Ultrafiltrates von Rinderplasma und einer Lösung von NaCl und $NaHCO_3$ (nach Mond und Netter) (26)

—— Ultrafiltrat
..... Kontrollkurve

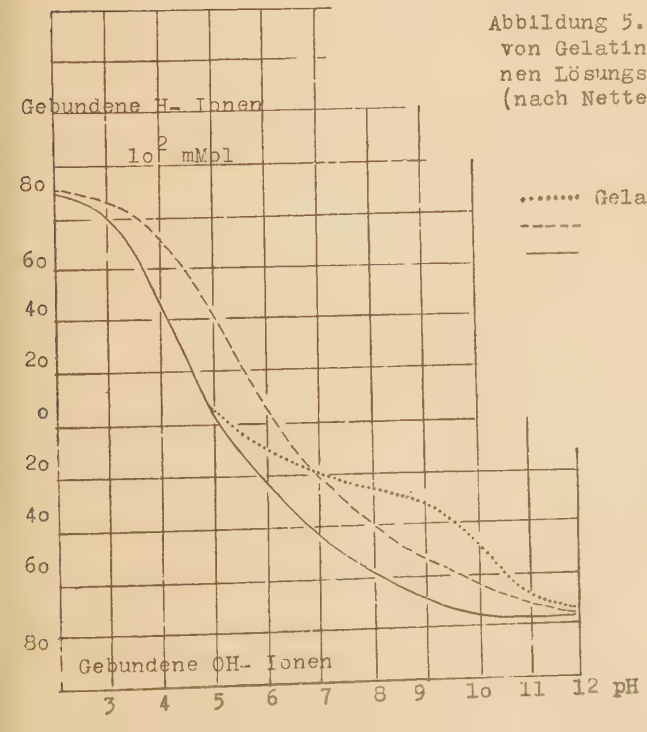


Abbildung 5. Titrationskurven von Gelatine bei verschiedenen Lösungsmitteln. (nach Netter) (27)

..... Gelatine in Wasser
----- in Alkohol
—— in Formaldehyd.

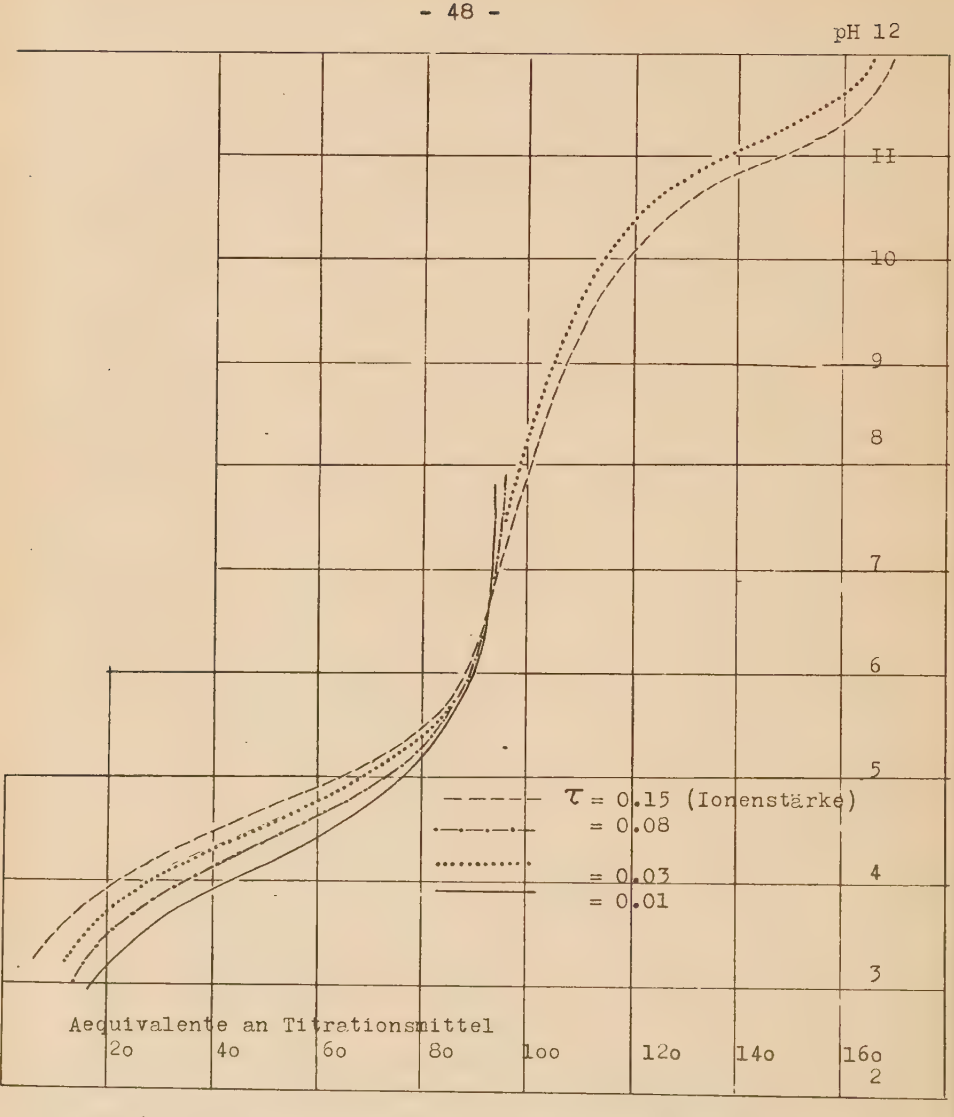
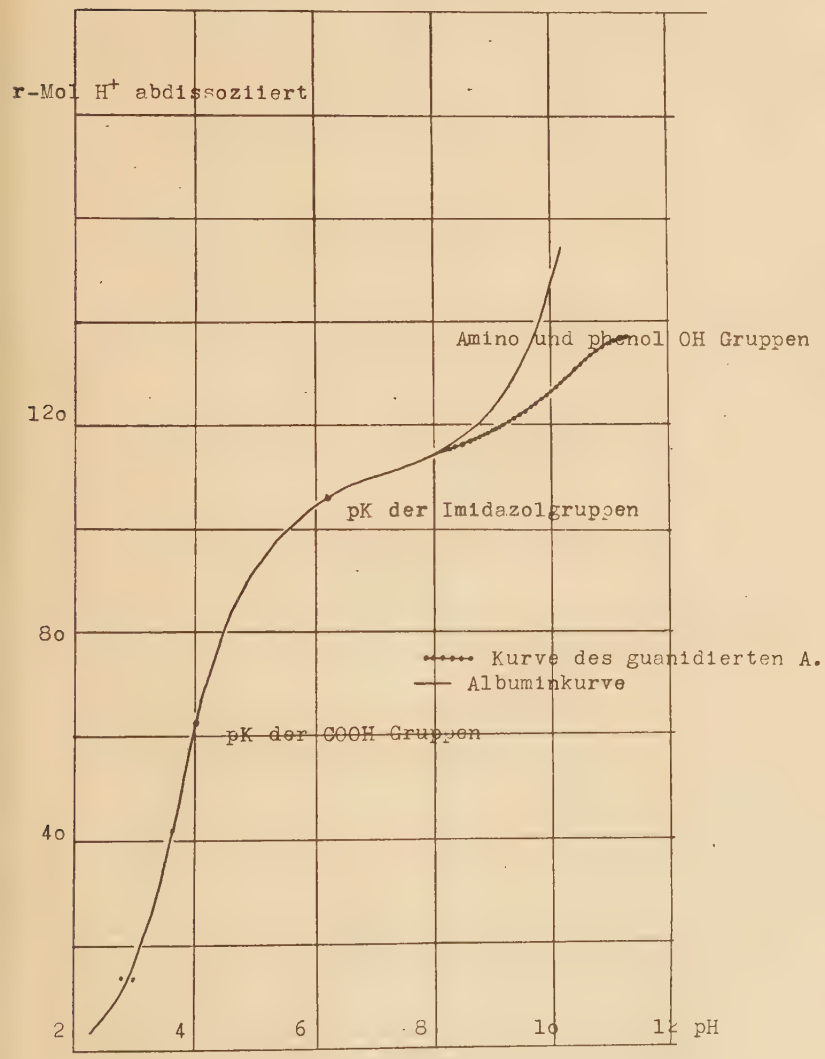


Abb. 6. Titrationskurven des Serumalbumins (Rind) bei drei verschiedenen Ionenstärken. (nach TANFORD, SWANSON und SHORE)

Abbildung 7. Titrationskurve von guanidiertem Serumalbumin bei 25
$\mu/2$ o.15o (Ionenstärke)



Aus Tanford 195o J.Am.Chem.Soc 72 441

Abb. 8. Abhängigkeit der Titrationskurve des Humanalbumins von der Ionenkonzentration.

1 = 1o g% Humanalbumin in 1o34 mosm. NaCl
2 = 1o g% " 688 " "
3 = 1o g% " 31o " "
4 = 1o g% " 155 " "
5 = 1o g% " 68 " "
6 = 1o g% " in aqua dest.

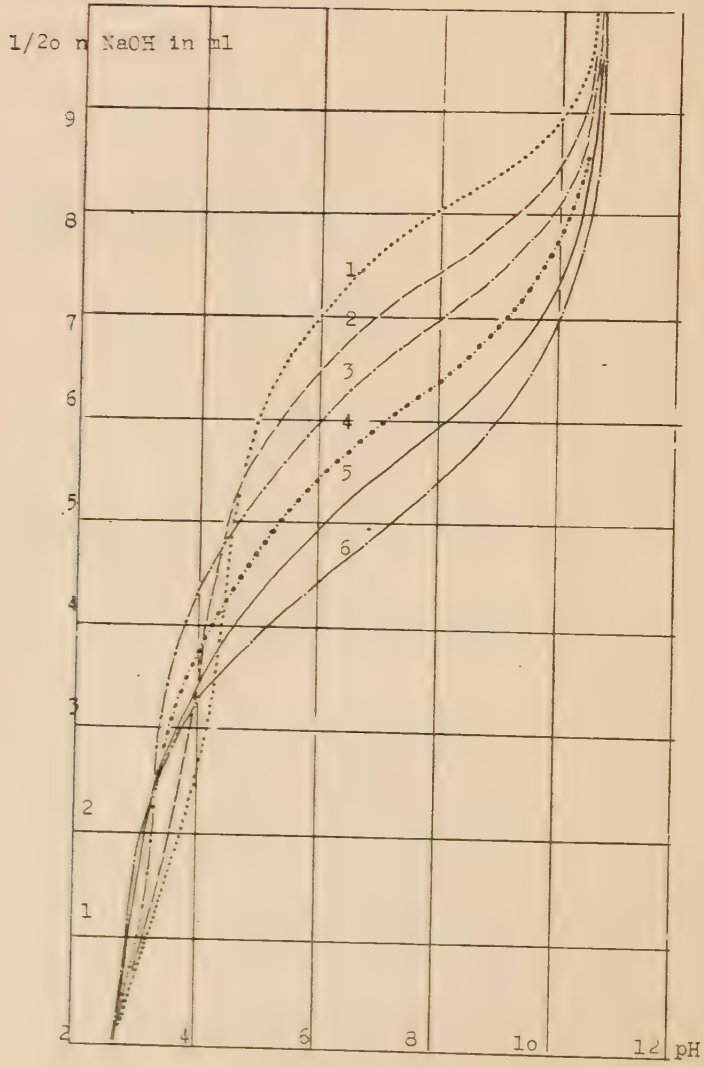


Abb. 9. Beeinflussung der Titrationskurve des Humanalbumins durch Harnstoff.

1 = 1o g% Humanalbumin 48o mosm. Harnstoff
2 = 1o g% " 32o " "
3 = 1o g% " o " "

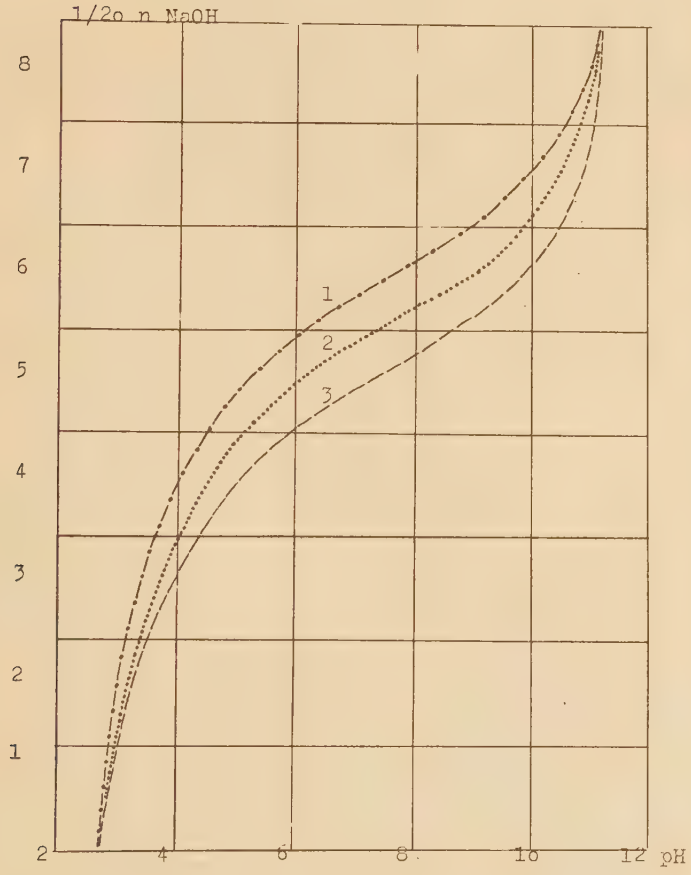
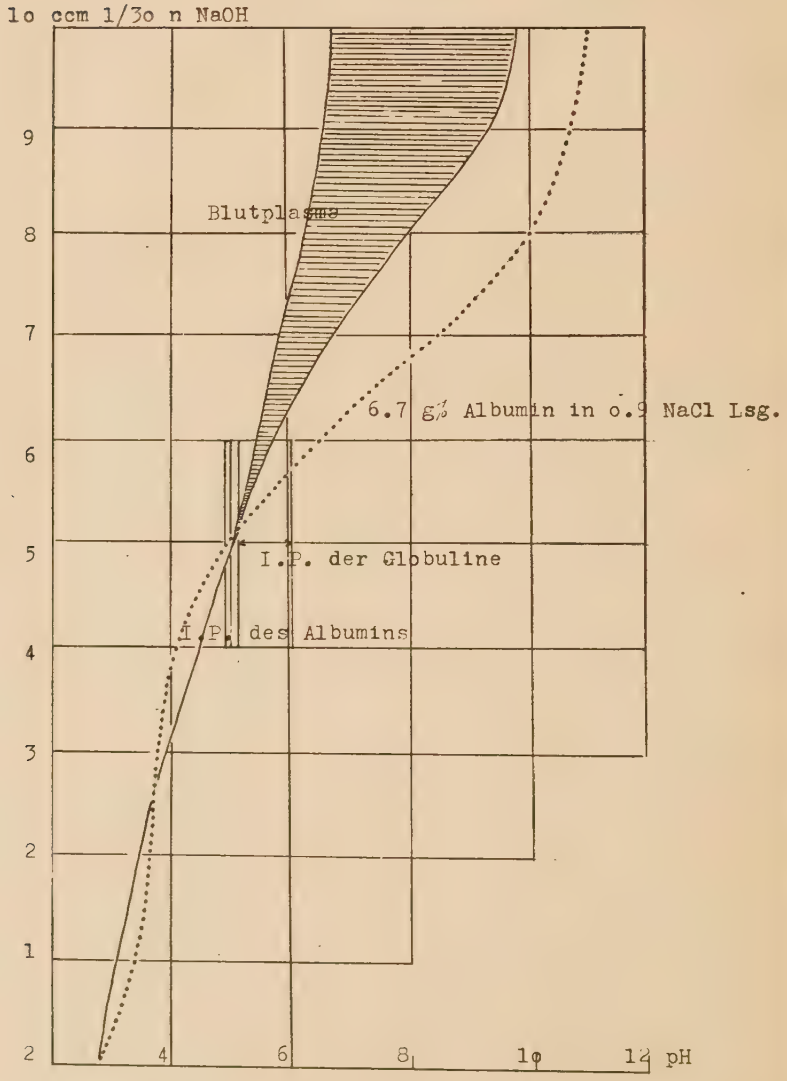


Abbildung 1o. Gegenüberstellung der Titrationskurve des Humanalbumins und der des Plasmas gesunder Personen.
Die Humanalbuminmenge entspricht 6.7 g% Plasmaeiweiss.



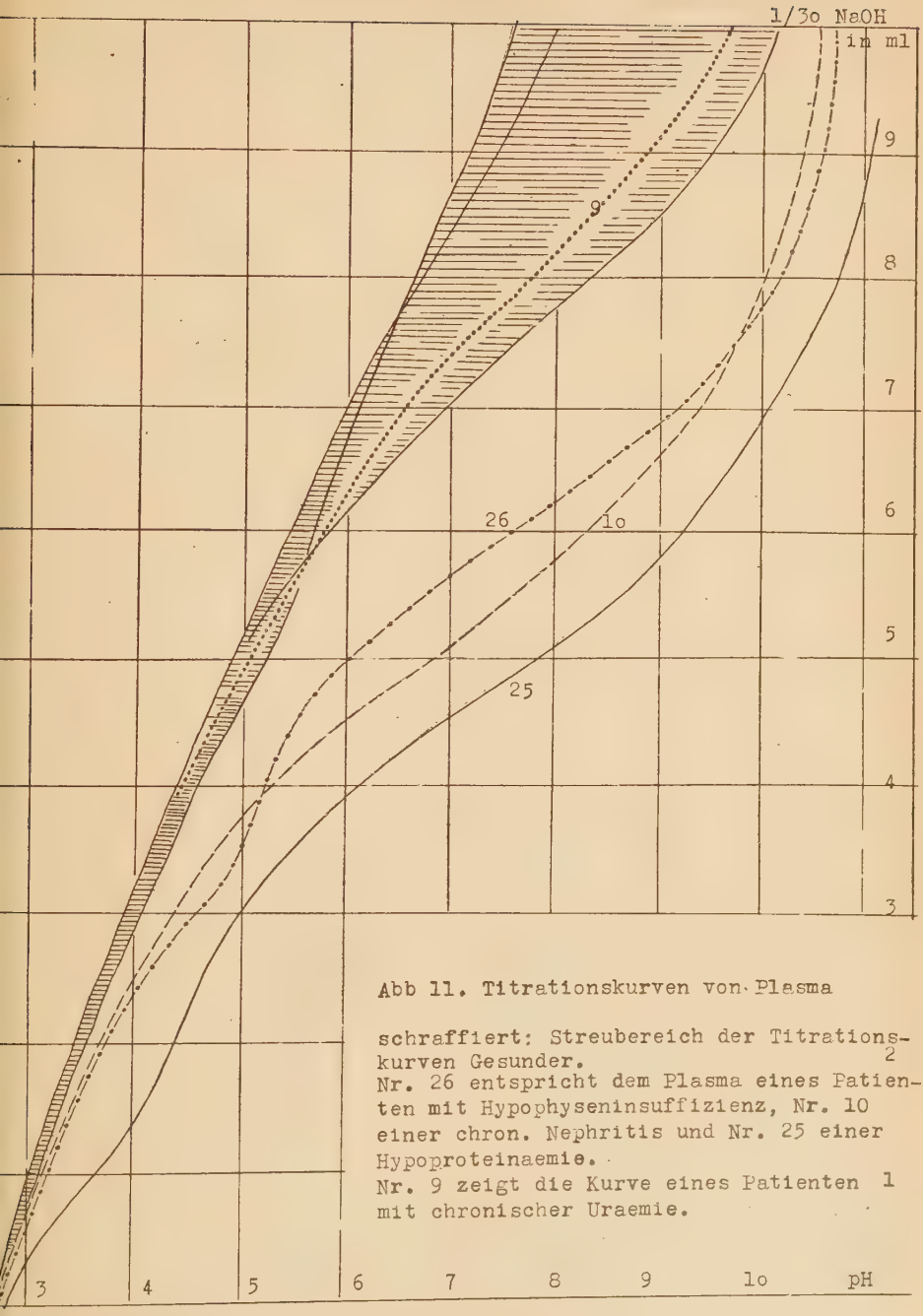


Abb 11. Titrationskurven von Plasma

schraffiert: Streubereich der Titrationskurven Gesunder.
Nr. 26 entspricht dem Plasma eines Patienten mit Hypophyseninsuffizienz, Nr. 10 einer chron. Nephritis und Nr. 25 einer Hypoproteinaemie.
Nr. 9 zeigt die Kurve eines Patienten mit chronischer Uraemie.

Abb.12 Titrationskurven eines Patienten mit chronischer Ateminsuffizienz und einer gesunden Person in längeren Zeitabständen geschrieben.(aus je 5 Messungen wurden je 3 Extremwerte ausgewählt)

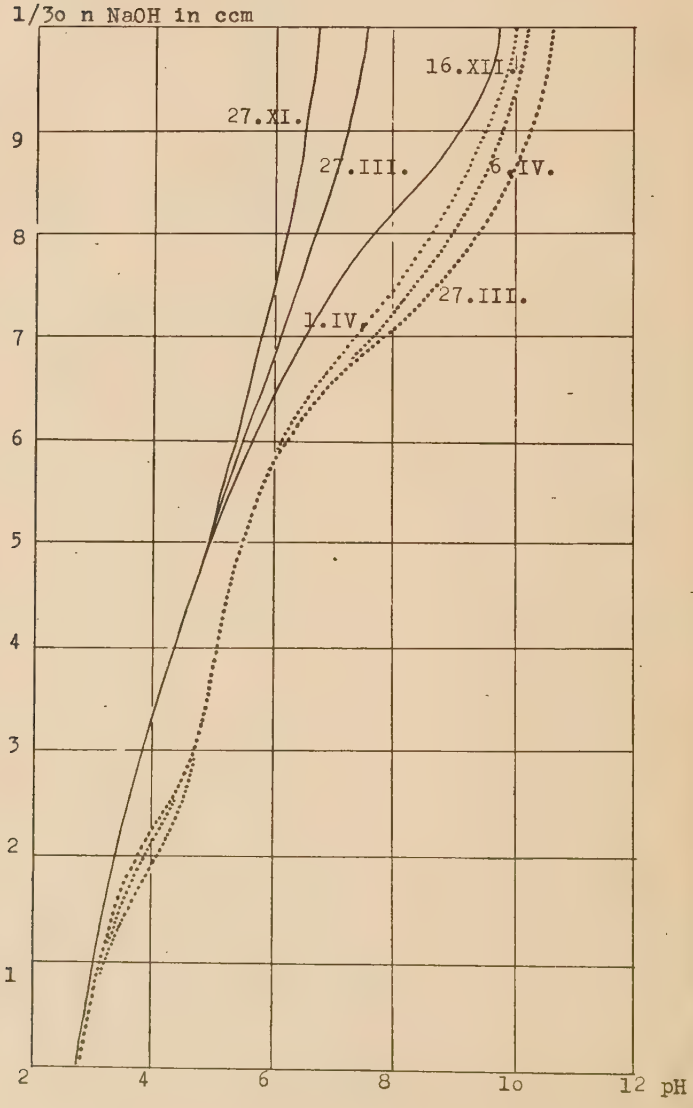


Abbildung 13. Gegenüberstellung einiger Plasmatitrationskurven von verschiedenen Patienten. Zu beachten ist das Verhältnis der Eiweisskonzentration zur Steigung der Kurve zwischen pH 3 und pH 4.

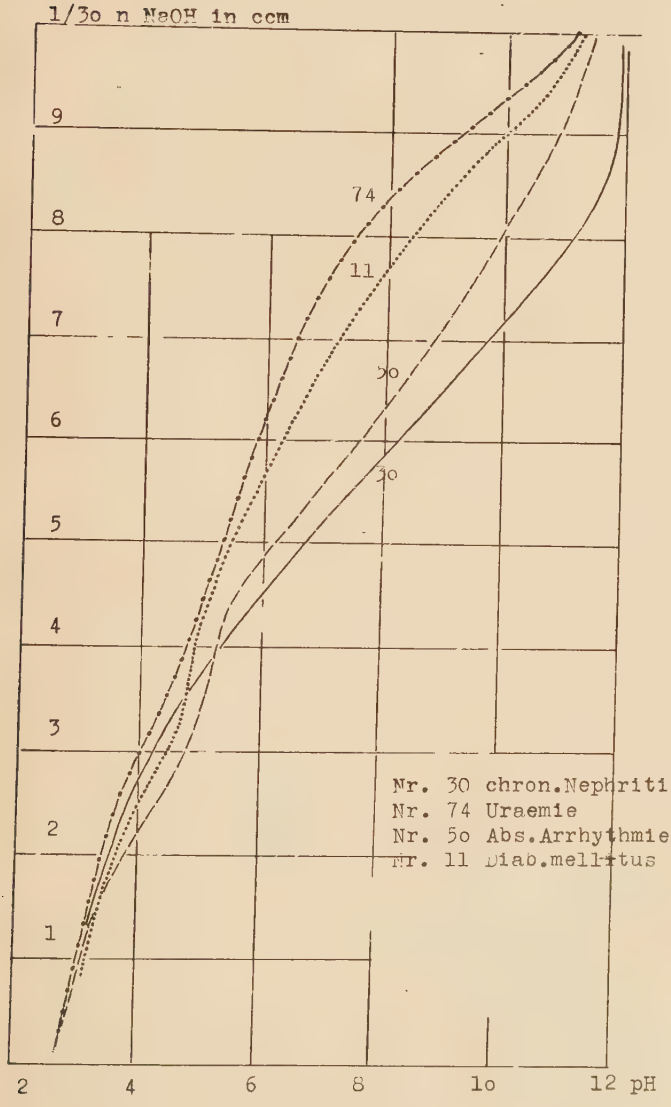


Abbildung 14. Plasmatitrationskurven eines Patienten mit Hypophyseninsuffizienz, im Abstand von einigen Tagen gemessen.

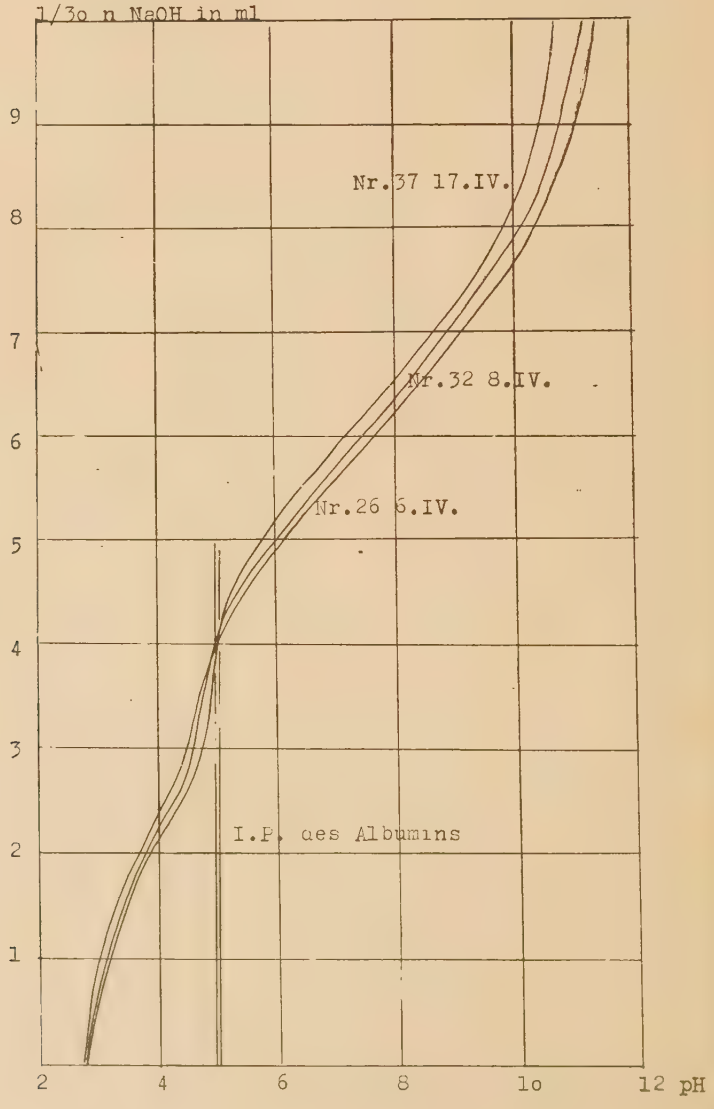
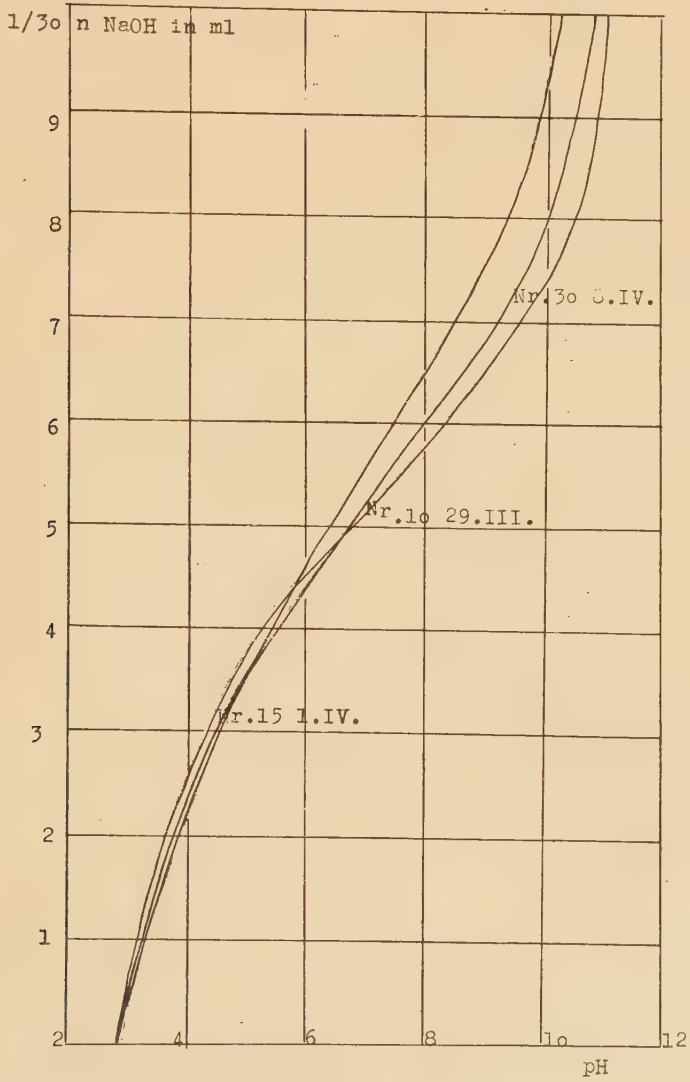


Abbildung 15. Plasmatitrationskurven eines Patienten mit chronischer Nephritis (Harnstoff 215 mg%) im Abstand von einigen Tagen gemessen.



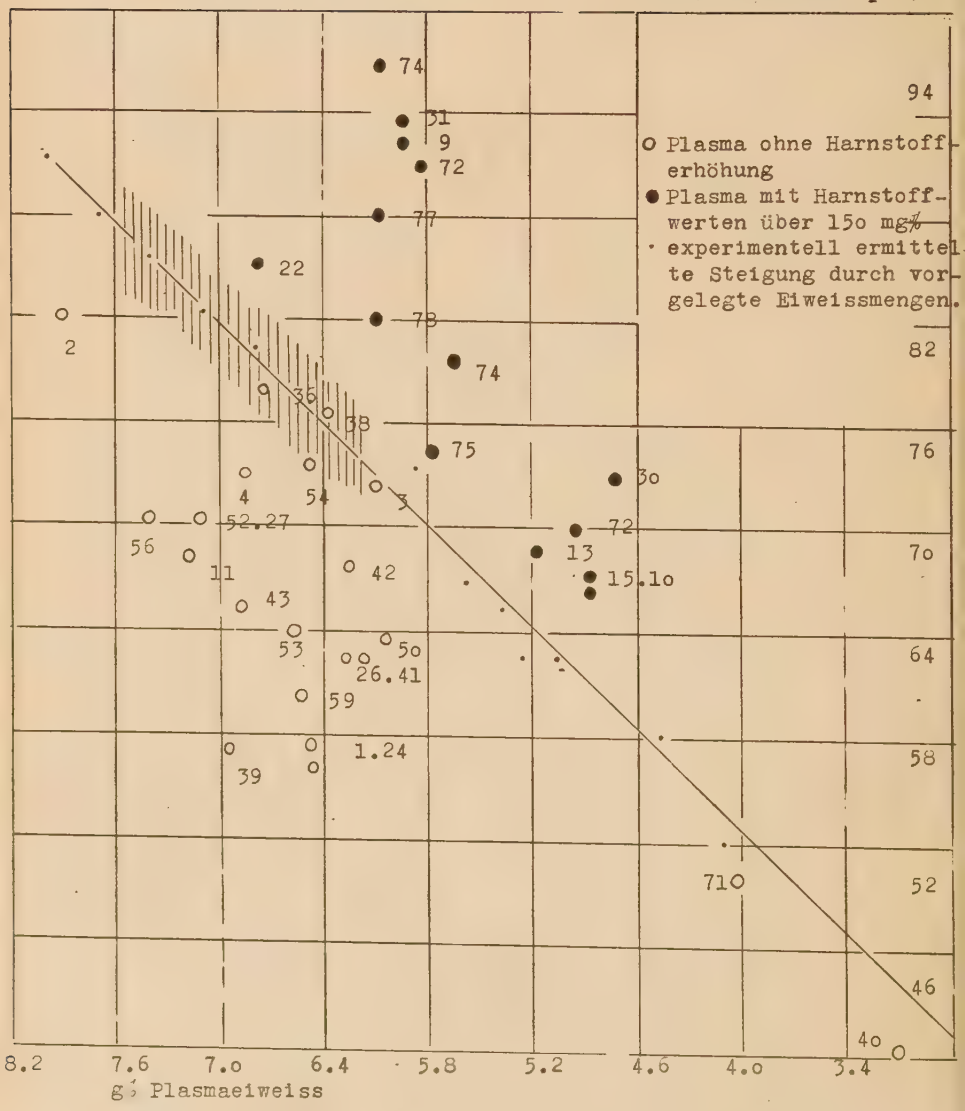


Abb.16. Steigung der Titrationskurve zwischen pH 3 und 4 im Verhältnis zur Eiweisskonzentration des Plasmas.
Das Steigungsmass zwischen pH 3 und 4 entspricht dem tg der Kurve zwischen pH 3 und 4 und gibt damit den durchschnittlichen Verbrauch an NaOH in diesem Bereich an.

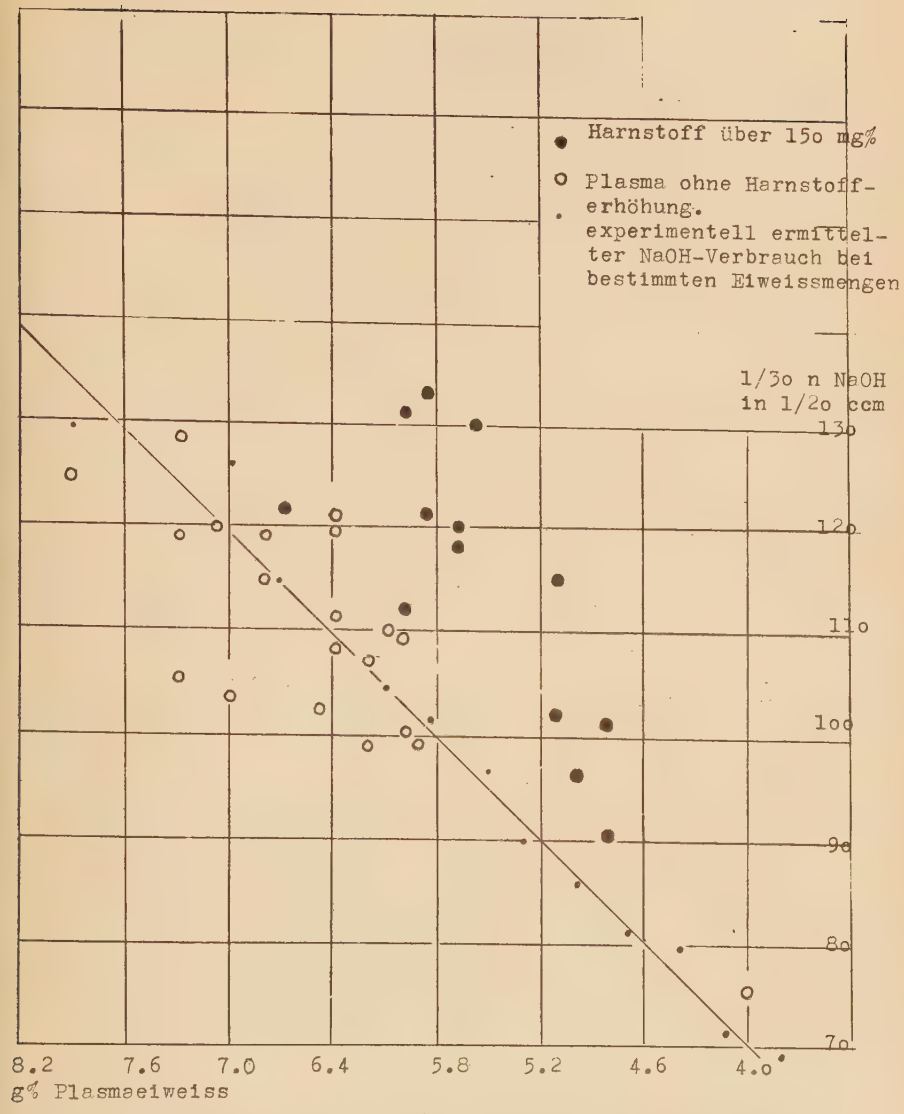


Abb 17. Verbrauch an Titrationsmittel bei pH 7 im Verhältnis zur Eiweiss konzentration des Plasmas.

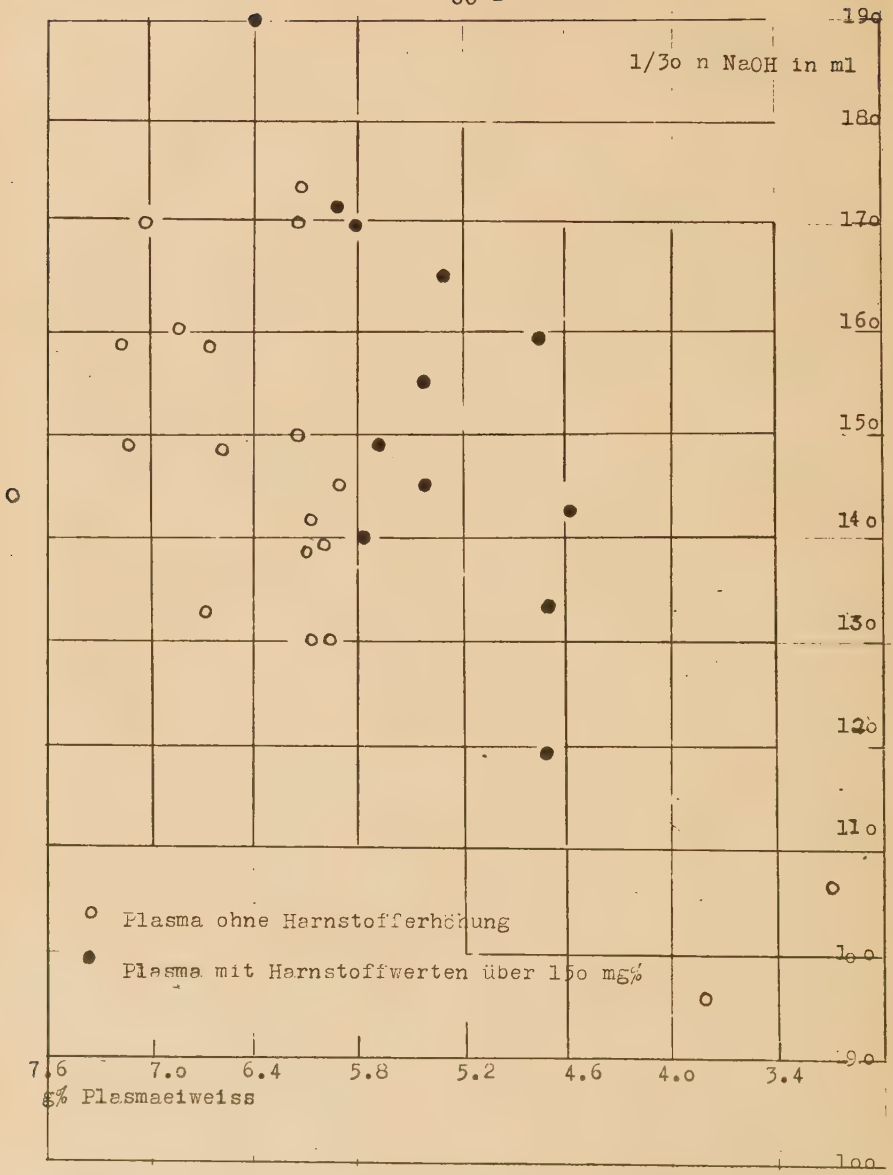


Abbildung 18. Verbrauch an Titrationsmittel bei pH 9 im Verhältnis zur Eiweisskonzentration des Plasmas.

Literaturangaben.

1.) Anweisung zum Betrieb des Titrationsgerätes der Firma Metrom A.G. Herisau Schweiz 1960

2.) BALA L.v. : Die Änderung der Reaktion des Blutes in vitro. Pflügers Archiv für Physiologie 1938

3.) BARRON E.S.: Modern Trends in Physiology and Biochemistry. New York 1952

4.) BEST and TAYLOR : Physiological Basis of Medical Practice V, Baltimore 1950

5.) BÜCHNER F., LETTERER E., ROULET : Handbuch der Allgemeinen Pathologie 5. Band/2.Teil Springer Verlag.

6.) BREUSCH : Lehrbuch der gesamten Chemie. Springer 1954

7.)CANNON R.K., PALMER A.H., KIBRICK A.C. : Journal of Biol. Chem. 142 803 1942

8.) COHN and EDSALL I.T. : Proteins, Aminoacids and Peptides. Reinhold Pub. Corp. New York p 449 ff

9.) CONRAD C. : Untersuchungen über die Titrationsacidität des Urins. Med. Diss. (Tübingen) 1962

10.) CULLEN : J. biol. Chem. 30 396 1917

11.) EDSALL : Aspects actuels de la biochemie des acides amines et des proteines. Edition desoir Liege 1958

12.) FLASCHENTRÄGER und LEHNARTZ : Phsiologische Chemie
2. Band: Stoffwechsel,
Springer 1954

13.) FREY J. : Die Nierensekretion;
in Heilmeyers Lehrbuch der spez.
Pathologischen Physiologie.
Fischer Stuttgart 1960

14.) GAMBEL : Relationship of Alterations of Elektrolyte
Structure of Plasma, (produced by
various conditions of disease, to
change bicarbonate)
Lane Medical Lectures Volume V. Nr.1
(Stanford University Publications)

15.) GREENBERG : Interactions between Calcium and Pro-
teins. Advances in Protein Chemistry.
Vol. I 136 1944

16.) HAUROWITZ : Fortschritte der Biochemie von
1938 - 1947
Basel/New York S. Karger 1948

17.) HEILMEYER L. : Lehrbuch der spez. path. Physiologie.
Gustav Fischer Vrl. Stuttgart 1960

18.) HENDERSON : Blut, seine Pathologie und Physiologie.
Vrl. v. Theodor Steinkopff
Dresden 1932

19.) IRVING and KLOTZ : Some Metal Complexes with Pro-
teins and other large Molecules.
aus Guzmans and Barrons: Modern
trends in Physiology and Biochemistry.
s. 436 1952

20.) KLOTZ J.M., WALKER F.M. , and PIVAN :
The binding of organic ions by protein.
R.B. 1946 J.Am. Chem. Soc. 68,1486

21.) LEHMAN G. : Die Wasserstoffionenmessung.
J. Ambrosius Barth Vrl. Leipzig 1942

22.) LEUTHARDT F. : Lehrbuch der physiologischen Chemie.
Verlag Walter de Gruyter und Co.

Pufferung und Pufferungssysteme.
In Abderhaldens Handbuch der biolog.
Arbeitsmethoden.
Abt. III; Teil A.2 1930

23.) LINDERSTROEM - LANG : Compt. rend. Trav. lab.
Carlsberg 15 Nr. 7 1924

24.) MARTIN A.J.P.; SYNGE R.L. : Analytical Chemistry
of Proteins.
aus: Advances in Protein Chemistry
Vol. II 1954

25.) MICHAELIS L. and BARRON E.S.G. : Interactions of
electrolytes with proteins.
J. Biolog. Chem. 83.91 1929

26.) MOND R. und NETTER H. : Zur Frage des sog. Anionen-
defizits im Blutserum.
Pflügers Archiv 207/ 115 1925

27.) NETTER H. : Theoretische Biochemie.(Physikalisch-
chem. Grundlagen der Lebensvorgänge).
Springer Vrl. 1959

28.) REIN und SCHNEIDER : Physiologie des Menschen.
2. Auflage. Springer Vrl. 1956

29.) SÖRENSEN S.P.L. : Compt. Rend. Trav. Lab.
Carlsberg 1268 1917

30.) SCATCHARD G., SCHEINBERG J.H. and ARMSTRONG S.H. :
J. Am. Chem. Soc. 72 535 1950

31.) STAUFF J. : Kolloidchemie.
Springer Vrl. 1960

32.) STEINHARDT J. und ZAISER E.M. : Analytical Chemistry of Proteins.
aus: Advances in Protein Chemistry
Volume X. S. 155 ff. 1955

33.) TANFORD C. : Hydrogen Ion Equilibria in Native and modified Human Serum Albumin.
Ionizable Groups in Serum Albumin.
Table IX.
J. Am. Chem. Soc. 72 p 441

The Interpretation of Hydrogen Ion Titration Curves of Proteins.
aus: Advances in Protein Chemistry
Academic Press New York and London
Seite 69 1962

34.) WATZEL : Das Säure-Basen-Gleichgewicht in seiner klinischen Bedeutung und seine Erfassbarkeit.
med. Diss. (Marburg) 1956

35.) WUHRMAN F. und WUNDERLY : Die Bluteiweißkörper des Menschen.
2. Auflage/Basel
Benno Schwabe Verlag 1952

Für die Untersuchungen am Humanalbumin wurde ein durch Kristallisation gewonnenes Präparat der Firma Behring-Werke benutzt.

L E B E N S L A U F

Am 25.Oktober 1936 wurde ich, Hansjörg Bettex, als Sohn des Baurates Hanns Bettex und seiner Ehefrau Christa geb. Dieterich in Hannover geboren.

Im Februar 1959 legte ich auf dem Gymnasium in Großburgwedel die Reifeprüfung ab.

Während der vorklinischen Semester und des ersten klinischen Semesters studierte ich an der Universität in Kiel. Dort legte ich im Mai 1960 und im Oktober 1961 die naturwissenschaftliche und die ärztliche Vorprüfung ab.

Seit dem 2.klinischen Semester studiere ich in Tübingen und bestand dort das Medizinische Staatsexamen am 11.Dezember 1964.

Fotodruck Frau Elly HUTH Tübingen